

IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
BEIM
BLASEN- UND NIERENKARZINOM

Franz Xaver Weinfurtnner

1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung

Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Brendel

IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

BEIM

BLASEN- UND NIERENKARZINOM

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Franz Xaver Weinfurtnner

aus

Massing

München, 1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. C. Hammer
Mitberichterstatter:	Professor Dr. W. Brendel
Dekan:	Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 3.8.1982



DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Gewidmet meinen lieben Eltern und meinen Onkel Dr.med. F.X. Kattum

INHALTSVERZEICHNIS

=====

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>PATIENTENGUT</u>	15
2.1. Blasenkarzinom-Patienten	15
2.2. Nierenkarzinom-Patienten	21
2.3. Vergleichs-Patienten	26
2.4. Material von Patienten	29
3. <u>KLINIK</u>	32
3.1. Zur Klinik des Blasenkarzinoms	32
3.2. Zur Klinik des Nierenkarzinoms	40
4. <u>METHODIK</u>	46
4.1. Indirekte Immunfluoreszenz	46
4.2. Gewinnung von Lymphozyten	55
4.3. Bestimmung der B-Lymphozyten	57
4.4. Bestimmung der T-Lymphozyten	58
4.5. Bestimmung der Gesamtlymphozyten	59
4.6. Suppressor-Zell-Test	60
5. <u>RESULTATE</u>	70
5.1. Indirekte Immunfluoreszenz mit Tumor- und Vergleichsgewebe	70
5.1.1. Blasenkarzinomzellen, Nachweis von Antitumor-Antikörpern der Klasse IgG in den Seren	71
5.1.2. Nierenkarzinomzellen, Nachweis von Antitumor-Antikörpern der Klasse IgG in den Seren	73
5.1.3. Blasenkarzinomzellen, Nachweis von Antitumor-Antikörpern der Klasse IgM in den Seren	76

	Seite
5.1.4. Nierenkarzinomzellen, Nachweis von Antitumor- Antikörpern der Klasse IgM in den Seren	77
5.1.5. Nierenkarzinomzellen, Nachweis von Antitumor- Antikörpern der Klasse IgA in den Seren	79
5.1.6. Blasenkarzinomzellen, Nachweis von F(ab) ₂ -Fragmenten	79
5.1.7. Nierenkarzinomzellen, Nachweis von F(ab) ₂ -Fragmenten	81
5.2. Nachweis von Tumorzellen in Blasenspülungen mittels indirekter Immunfluoreszenz	84
5.3 Bestimmung der Gesamtlymphozyten und Differenzierung in T- und B-Lymphozyten	93
5.4. Suppressor-Zell-Aktivität von Lymphozyten bei Blasen- und Nierenkarzinom-Patienten sowie bei Vergleichsgruppen	97
5.4.1. Einfluß von Suppressorzellen auf eine Gemischte Lymphozyten Kultur	101
5.4.2. Einfluß von Suppressorzellen auf durch PHA stimu- lierte allogene Lymphozyten	103
5.4.3. Einfluß von Suppressorzellen auf durch PWM stimu- lierte allogene Lymphozyten	106
5.4.4. Einfluß von Suppressorzellen auf durch ConA stimu- lierte allogene Lymphozyten	109
<u>6. DISKUSSION</u>	112
6.1. Indirekte Immunfluoreszenz mit Tumor- und Vergleichs- gewebe, Nachweis von Antitumor-Antikörpern	112
6.2. Tumorzell-Nachweis in Blasenspülungen mittels in- direkter Immunfluoreszenz	130

	Seite
6.3. Gesamtlymphozyten-Bestimmung und T- und B-Lymphozyten-Verteilung	135
6.4. Suppressor-Zell-Aktivität bei Blasen- und Nierenkarzinom-Patienten sowie bei Vergleichsgruppen	138
<u>7. ZUSAMMENFASSUNG</u>	159
<u>8. LITERATURVERZEICHNIS</u>	161
<u>9. ANHANG</u>	182
Dank	182
Lebenslauf	183

Verwendete Abkürzungen

ALG	Anti-Lymphozyten-Globulin
ASZ	Aktivierte Suppressor-Zellen
ConA	Concanavalin A
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FITC	Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat
MLC	Gemischte Lymphozyten Kultur (Mixed Lymphocyte Culture)
PHA	Phytohämagglutinin
PWM	Pokeweed Mitogen
SSZ	Spontane Suppressor-Zellen
SZA	Suppressor-Zell-Aktivität
F/P-Quotient	Fluoreszein/Protein-Quotient
U/min	Umwandlungen pro Minute

1. EINLEITUNG =====

Voraussetzung für das Zustandekommen einer Immunreaktion ist das Auftreten eines Antigens, etwa in Form eines Fremdproteins, Virus oder Bakteriums. Auch Zellen bösartiger Tumoren besitzen auf ihrer Zelloberfläche Antigenmoleküle, die vom Wirtsorganismus als körperfremd erkannt werden und gegen die er eine Immunreaktion einleitet. Diese Tumorantigene scheinen teils tumorspezifischer, d.h. nur bei bestimmten, histologisch definierten Tumoren, wie z.B. dem Urothelkarzinom vorkommend, teils unspezifischer Natur zu sein. Auch bei den hier untersuchten Blasen- und Nierenkarzinomen ist bislang die Spezifität der Tumorantigene nicht geklärt (2).

Neben Tumorantigenen konnten auf malignen Zellen auch noch ABO- und andere, auch auf normalen Zellen vorkommende Antigene nachgewiesen werden (79,123,125). Während hochdifferenzierte Tumoren diese Glykoproteine noch in großer Anzahl auf ihrer Oberfläche tragen, gehen sie mit zunehmender Entdifferenzierung verloren, wobei diese immunologische Entdifferenzierung früher nachweisbar ist als eine histomorphologische. Tumorzellen besitzen also neben unspezifischen und wahrscheinlich spezifischen Tumorantigenen je nach Differenzierungsgrad noch Oberflächenmoleküle der ursprünglichen Körperzellen. Der Verlust physiologischer Membranmoleküle geht parallel mit dem Auftreten von Tumorantigenen. Neben Tumor-Oberflächenantigenen existieren auch noch zytoplasmatische und nukleäre Tumorantigene, die

keine unmittelbare Bedeutung für die Tumorabwehr haben, da sie außerhalb der Reichweite des Immunsystems liegen und erst bei einem Zellverfall in Kontakt mit ihm geraten (100).

In der Stärke der Tumorantigene - darunter versteht man das Ausmaß der hervorgerufenen Immunantwort - gibt es allerdings unter den Tumoren interessante Unterschiede: Bei Tieren stehen den spontan auftretenden Karzinomen, die nur in geringem Maße oder manchmal gar nicht immunogen sind (93), die virusinduzierten und auch die chemisch erzeugten gegenüber, die eine starke, v.a. von T-Lymphozyten getragene Abwehrreaktion hervorrufen. Durch bestimmte Chemikalien kann man Tumoren erzeugen, die viele verschiedene, aber auch einige gemeinsame Antigene besitzen. Das hohe Maß an Individualspezifität beruht auf dem ursächlichen Mechanismus der chemischen Karzinogenese, nämlich der Reaktion mit der DNS, die an vielen verschiedenen Punkten ansetzen kann und somit auch vielerlei Ausprägungsformen finden kann (107). Dagegen haben die durch das gleiche Virus verursachten Tumoren alle das gleiche virusspezifische Antigen auf ihrer Oberfläche (13,16,107,150). Eine Erklärung für die unterschiedliche Immunogenität wäre die Selektion von Zellen mit schwachen Antigenen bei Spontantumoren und das "Überrennen" des Immunsystems durch massive gleichzeitige chemische Induktion von Krebszellen, ohne daß eine Selektion nötig wäre.

Die Tumorzelle ist ferner in der Lage, Antigene in die Zirkulation abzugeben, wie z.B. das Carcinoembryonale Antigen (CEA) mit einem

Molekulargewicht von 200.000, das bei Blasen-, Colonkarzinom und anderen Malignomen im Serum und Urin nachgewiesen werden kann, oder das Alpha-Fetoprotein, das vor allem beim Leberkarzinom gefunden wird (71,78). In diesen Namen kommt die chemische Verwandtschaft mit embryofötal vorkommenden Molekülen zum Ausdruck, eine Beobachtung, die man als Entdifferenzierung der Tumorzelle zu primitiven Vorstufen interpretieren kann. Die Produktion solcher Proteine ist in der normalen adulten Zelle unterdrückt, anscheinend schon zu der Zeit, als das Registrieren von Molekülen als körpereigen oder körperfremd erfolgte, so daß diese onkofötalen Proteine nun bei einem Wiederauftreten als Antigene gelten.

Wollen wir nun nach der Betrachtung des einen Schenkels der Immunreaktion - der Tumorantigene - unser Augenmerk auf den anderen, nämlich die Immunantwort des Wirtsorganismus richten. 1908 war Paul Ehrlich der erste, der dem Immunsystem neben der Abwehr von Infektionen als weitere Funktion das Verhindern der Tumorbildung zuschrieb (34). 1959 behauptete Thomas (143), daß der gleiche Mechanismus, der zur Transplantationsabstoßung führe, auch für die Abwehr von Neoplasien zuständig sei, und 1970 stellte Burnet seine Theorie von der "Immunsurveillance of tumors" auf, die auch heute noch, wenn auch in mancher Hinsicht modifiziert, im Prinzip akzeptiert wird (24).

Man könnte die derzeit vertretenen Meinungen über die Immunantwort, die in einzelnen Bereichen allerdings widersprüchlich sind, ungefähr

folgendermaßen zusammenfassen:

Immunsurveillance existiert, d.h. das Immunsystem ist laufend auf der Suche nach Zellen, die durch ständig vorhandene mutagene und onkogene Umwelteinflüsse entarten, und vernichtet diese. Solche Anfangstumoren werden durch präexistente, genetisch festgelegte Zellen, "natural killer cells", oder durch "natürliche Antikörper" bekämpft (41,70,90,103,139). Durch spezifische, genetisch determinierte Membranrezeptoren sind die "natural killer cells" in der Lage, ein breites Spektrum von Tumorantigenen zu erkennen und Zellen, die solche Antigene tragen, zu vernichten. Diese primäre Immunantwort führt jedoch nicht zu einem immunologischen Gedächtnis. Gelingt dem Tumor ein Durchbruch, so tritt eine sekundäre Immunantwort in Form von T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und Antikörpern in Aktion. Diese Immunantwort zweiter Art soll auch zu einem Immungedächtnis führen.

Es sind mehrere Mechanismen für eine durch immunkompetente Zellen bewirkte Zytolyse der Tumorzellen bekannt (13,68).

1. Die direkte T-Zell-Zytotoxizität
2. Die Antikörper abhängige Zytolyse
3. Die Zytolyse durch "armierte" Makrophagen

zu 1.: Die zytotoxische Reaktion läuft in zwei Phasen ab: Zuerst kontaktierten die T-Lymphozyten mit ihren für Tumorantigen spezialisierten Rezeptoren die neoplastische Zelle spezifisch, worauf dann der eigentliche lytische Prozeß erfolgt. Die Ursache für die Lyse ist unbekannt, man nimmt jedoch an, daß die Membranpermeabilität der Tumorzellen durch lymphozytäre Faktoren fortschreitend verändert wird,

wodurch die osmotische Regulation der Zelle Schaden nimmt und die Membran schließlich rupturiert.

zu 2.: Neben diesem Hauptmechanismus der zellulären Tumorabwehr gibt es noch die Antikörper abhängige Zytolyse. Ein Antikörper meist vom IgG-Typ reagiert spezifisch mit dem Tumor-Zellmembran-Antigen und an das F(c)-Ende des Antikörpers lagert sich ein Lymphozyt mit einem entsprechenden F(c)-Rezeptor an. Solche F(c)-Rezeptoren findet man bei Lymphozyten, die weder den T- noch den B-Lymphozyten zugeordnet werden können, ferner noch bei Makrophagen und natürlichen Killerzellen. Die angelagerte Zelle bewirkt dann die Lyse der Tumorzelle. Dieser Prozeß läuft aber hauptsächlich bei der Abwehr von Bakterien und Pilzen ab.

zu 3.: Makrophagen wirken ebenfalls zytotoxisch, einerseits unspezifisch durch direkten Kontakt mit Tumorzellen, andererseits kann der Prozeß auch spezifisch ablaufen, indem sie sich mit tumorspezifischen Antikörper bewaffnen. Die Makrophagen-Zytotoxizität kann durch Adjuvantien wie BCG oder Glukan gesteigert werden. Eine weitere Funktion der Makrophagen besteht in der Potenzierung der Abwehrkapazität. Fremdanigen wird phagozytiert, in besonderer Weise aufbereitet und die Information darüber an das Immunsystem weitergegeben (32,33,105).

Die Rolle von T-Lymphozyten bei der Tumorabwehr wurde vor allem an Beobachtungen bei Patienten mit T-Zell-Defektimmunopathien und im Tierexperiment bei thymuslosen, nackten Mäusen oder ALG-behandelten Mäusen studiert. Bei einem Fehlen von T-Zellen ist das

allgemeine Auftreten von Karzinomen nicht oder nur kaum erhöht, Tumoren des lymphatischen Systems und tierexperimentell induzierte virale Tumoren kommen hingegen gehäuft vor. Dies läßt den Schluß zu, daß T-Lymphozyten bei der Abwehr dieser Tumorarten die entscheidende Rolle spielen.

Meßbar ist diese zelluläre Zytotoxizität in in-vitro Tests wie z.B. dem Leukozyten-Adhärenz-Inhibitions-Test oder dem Chromium-release-Test. Die Zytotoxizität fällt mit zunehmendem Stadium der Karzinomausbreitung ab. Patienten mit hoher Zytotoxizität haben weniger Rezidive und somit eine bessere Prognose.

Die Rolle der Antikörper wurde schon angesprochen: Sie wirken zusammen mit Lymphozyten und Makrophagen, sind jedoch auch in der Lage, im Zusammenspiel mit Komplementfaktoren Tumorzellen anzugreifen und zu zerstören.

Obwohl es bisher viele Berichte über zelluläre Immunreaktionen bei Blasen- und auch bei Nierenkarzinompatienten gibt, haben nur wenige Autoren bisher die humorale Immunabwehr gegen diesen Tumor untersucht. Dies beruht auf dem großen Einfluß, den die Transplantationsforschung auf die Tumorummunologie ausübte, nämlich daß sich auch auf diesem Gebiet die Aufmerksamkeit vor allem auf T-Zell abhängige Immunreaktionen richtete. Hätte man dagegen nach Parallelen auf dem Gebiet der Infektionskrankheiten gesucht, wären ganz andere immunologische Gesichtspunkte, nämlich humorale, in den Vordergrund getreten. Für den Verlauf von Infektionskrankheiten sind zirkulierende Antikörper von überragender Bedeutung, weil sie die hämatogene Aussaat der Erreger verhindern. Es wäre daher verwunderlich, wenn nicht ähnliche

Verhältnisse auch bei malignen metastasierenden Erkrankungen existieren.

Das Interesse an humoralen Reaktionen wurde ferner durch die Meinung gedämpft, daß T-Zellen einen guten, B-Zellen aber einen schädlichen Einfluß auf den Verlauf einer Tumorerkrankung haben. Humoralen Faktoren wurde lange Zeit nur unter dem Gesichtspunkt des "Enhancements" und als "blocking factors" Beachtung geschenkt (65,67,132), mögliche positive Rollen, wie z.B. der Schutz vor Fernmetastasierung wurden erst später diskutiert (100). Der unterschiedliche natürliche Verlauf von Tumoren, die einerseits in einem Individuum über Monate und Jahre lokal wachsen können, ohne zu metastasieren, während bei anderen Patienten ein identischer Tumor innerhalb von Wochen und Monaten zu einer weiterverbreiteten Metastasierung führt, könnte eine Erklärung in der Anwesenheit zirkulierender Antitumor-Antikörper haben. Ein weiterer Grund für die Erforschung humoraler Immunreaktionen gegen Tumoren ist die Identifizierung von tumorassoziierten und tumorspezifischen Antigenen. Deren Nachweis hat große Bedeutung für die Entwicklung sowohl einer spezifischen serologischen Tumordiagnostik als auch eines spezifischen immunologischen Therapieansatzes.

Wieso kommt es trotz der beschriebenen Abwehrmechanismen des Immunsystems zur Entwicklung bösartiger Geschwülste? Folgende Möglichkeiten sind denkbar:

1. Überwinden der ersten Linie der Immunantwort

- a) zufälliges Verschontbleiben der Tumorzelle ("sneaking through")
- b) anfängliche Antigenveränderungen der Tumorzelle sind zu gering,

um erkannt zu werden.

- c) Abstoßung von Tumorantigen durch die Tumorzelle, die dadurch das Immunsystem einnebelt und selbst unauffällig wird.
- d) Ständige Antigenmodulation der Tumorzelle
- e) Überdimensionierte Glykokalix um Tumorzelle verhindert Erkennung
- f) Individueller genetischer Ausfall von Subpopulationen von natürlichen Killerzellen.

2. Überwinden der zweiten Linie der Immunantwort

- a) Tumorantigene abgedeckt durch Antikörper(-fragmente), die nicht mehr von Lymphozyten und Komplement erkannt werden (Enhancement) (65,67)
- b) Abdecken der Lymphozyten-Rezeptoren und Antikörper durch ausgeschüttetes Tumorantigen, bzw. Antigen lysierter Tumorzellen und Antigen-Antikörper-Komplexe (10,132).
- c) Regulationsmechanismen des Immunsystems: Auftreten von Suppressorzellen und Anti-idiotypischer Antikörper, die nach einer gewissen Zeit nach einem Feedback-Mechanismus die Immunantwort wieder begrenzen.

3. Veränderungen des Wirtsorganismus

- a) Genetische Disposition
- b) Schwächung des Immunsystems durch Alter, Stress und ähnliches
- c) Medikamentöse oder radiologische Immunsuppression
- d) Chronische Entzündungen und Regenerationsprozesse

Auf den Punkt 2c) soll näher eingegangen werden: Vor einigen Jahren bezweifelten viele Immunologie-Autoritäten, daß Immunregulation ein kompliziertes Netzwerk von zellulären und humoralen Antagonisten in Form von Helfer- und Suppressorzellen, von Antikörpern und Auto-Antikörpern umfaßt. Die zellulären Antagonismen sind mittlerweile etabliert, die immunologische Signifikanz von Auto-Antikörpern bedarf noch der Klärung, obwohl ihre Existenz außer Frage steht. Das Konzept der Immunregulation durch immunsuppressive Mechanismen beruht auf der Überlegung, daß das Immunsystem vermutlich nur für eine Antigenstimulation von bestimmter Dauer ausgerichtet ist. Nach einer gewissen Zeit tritt eine Regulation im Sinne eines negativen "feed back" auf, damit die Immunantwort nach der Elimination des Antigens, etwa eines Mikroorganismus, wieder gedämpft wird.

Lymphozyten, die dieses bewirken, also, die Aktivität von T- und B-Zellen heruntersetzen, werden Suppressorzellen genannt. Ein gegenteiliger Effekt wird den sogenannten Helferzellen zugeschrieben, nämlich die T- und B-Zellfunktion zu potenzieren. Helfer- und Suppressorzellen werden als entscheidende Mechanismen der Immunregulation betrachtet.

Eine den Suppressorzellen ähnliche Rolle auf dem humoralen Schenkel der Immunantwort wird Anti-Antikörpern zugeschrieben, die mit körpereigenen, möglicherweise veränderten Immunglobulinen reagieren und vor allem in Situationen mit chronischer Antigenstimulation gefunden werden.

Kirchner schreibt der Immunregulation eine wichtige Rolle bei vielen Aspekten des Krebsproblems zu (93):

- a) nach dem Konzept der Immunsurveillance wurde ein Fehler des Immunsystems in der Krebsentstehung angenommen (24).
- b) Die spezifische Immunantwort gegen den Tumor, die in vielen Fällen in vitro gut nachgewiesen ist, scheint von immunsuppressiven Mechanismen in vivo in ihrer Wirksamkeit beeinträchtigt zu werden (65).
- c) Nach Erreichen einer bestimmten Größe verursacht der Tumor eine unspezifische generelle Suppression des Immunsystems. Kennzeichnend für dieses Stadium sind immunologische Anergie, zirkulierende Immunkomplexe und Anti-Antikörper bei progressivem Tumorwachstum (69,101).

Unser Ziel war es, die Aktivität von Suppressorzellen bei Blasen- und Nieren-Ca-Patienten verschiedener Stadien zu messen und mit der Suppressor-Zell-Aktivität von Normalpersonen und Patienten mit entzündlicher Erkrankung zu vergleichen.

Ist es einem Tumor geglückt, der präformierten Tumorabwehr zu entgehen und wird er durch seine rasche Proliferationsfähigkeit immer größer, so ist bald die begrenzte Kapazität des Immunsystems erschöpft. Wird der Tumor klinisch manifest, so hat er bereits die verschiedenen Immunbarrieren durchbrochen und die immunologischen

Abwehrmaßnahmen stehen meist in keinem Verhältnis mehr zur Tumorzellmasse. Nur Ausnahmefälle, bei denen es trotz schon beachtlicher Tumorgröße zu einer Spontanremission kommt, lassen noch den Schluß zu, daß dem Immunsystem auch dann noch ein Be-zwingen des Tumors möglich ist.

Auswahl der untersuchten Tumorarten

Wir wählten für unsere tumorimmunologischen Untersuchungen das Blasen- und das Nierenkarzinom aus. Folgende Gründe waren dafür entscheidend:

Das Blasenkarzinom ist ein relativ leicht zugänglicher Tumor, durch eine Blasen-spülung ist relativ einfach Material für Untersuchungen zu gewinnen. Der natürliche Verlauf dieser Erkrankung kann nur schwer vorhergesagt werden: Vielen Fällen, die ziemlich benigne über lange Zeit verlaufen, stehen andere gegenüber, bei denen der Tumor besonders aggressiv zu sein scheint und der Patient schon nach kurzer Zeit seinem Leiden erliegt. Auf der einen Seite werden Karzinome beobachtet, die über lange Zeit nur oberflächlich wachsen, und, wenn sie auch häufige trans-urethrale Resektionen erfordern, doch selten invasiv werden. Andererseits kommen Tumoren vor, die sehr schnell die Blasenwand durchdringen und frühzeitig Metastasen setzen. Diese Variationsbreite

könnte sehr wohl auf individuell verschiedenen immunologischen Abwehrkräften gegen den Tumor beruhen (131).

Ein besonderes Problem beim Blasen-Ca stellt sein multilokuläres Vorkommen dar und damit verbunden seine hohe Rezidivrate, v.a. in den ersten zwei bis drei Jahren nach Primärtherapie (59). Häufige Nachkontrollen in diesem Zeitraum sind erforderlich und unsere Absicht war es zu prüfen, ob man durch immunologische Methoden die Diagnostik erleichtern oder verbessern könne.

Auch der natürliche Verlauf des Nierenkarzinoms bietet eine große Variationsbreite: Es wird wegen seiner Symptomenarmut meist spät entdeckt und weist dann schon eine beträchtliche Größe auf, eine Metastasierung liegt aber nur bei einem Drittel der Patienten bei Primärdiagnose vor. Manche Patienten leben viele Jahre mit ihren Metastasen, einige sogar Jahrzehnte mit einem unresezierten Primärtumor, die Regel ist allerdings, daß von Patienten mit einem Tumor, der wegen seiner Ausdehnung oder aus einem anderen Grund inoperabel war, nach drei Jahren nur mehr 4,4 % am Leben waren. Andererseits stellte Holland 1973 ca. 60 Fälle an Spontanremissionen von Nierenkarzinomen ohne adäquate Therapie aus der Weltliteratur zusammen und er berichtet von 40 Patienten, die nach einer Tumornephrektomie eine Regression von Metastasen (v.a. von Lungenmetastasen) zeigten. Er nahm als wahrscheinliche Erklärung für diese Befunde immunologische Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus an (76).

Neben diesen interessanten klinischen Beobachtungen spielten auch praktische Gründe eine große Rolle für die Auswahl des Nierenkarzinoms als geeignetes Untersuchungsobjekt. So stehen größere Mengen an Tumorgewebe zur Verfügung und daneben auch normales Nierengewebe aus dem gesunden Teil des Tumornephrektomie-Präparates.

Nach dieser Einführung in die Tumorimmunologie sollen nun unsere Fragestellungen, die sich aus dem bisher Gesagten ableiten, formuliert werden:

1. Nachweis von humoralen Immunreaktionen gegen Blasen- und Nierenkarzinome
 - a) Nachweis von Antitumor-Antikörpern in den verschiedenen Tumorstadien.
 - b) Um welche Arten von Antikörpern handelt es sich: IgG-IgM-IgA-F(ab)₂ ?
 - c) Wie spezifisch reagieren diese Antikörper verglichen mit
-Antikörpern von Patienten mit dem histologisch gleichen Tumor
-Antikörpern von Patienten mit einem anderen Tumor
-Antikörpern von gesunden Personen
 - d) Kann man durch positive Seren Tumorzellen in Blasenspülungen nachweisen?

2. Untersuchungen zur zellulären Immunität

- a) Gesamtlymphozytenzahl, T- und B-Zellbestimmung
- b) Bestimmung der Suppressor-Zell-Aktivität:
 - Höhe in verschiedenen Stadien
 - der Einfluß auf den Krankheitsverlauf und eventuelle therapeutische Konsequenzen werden diskutiert.

Auswahl der Testverfahren:

1. Zur Untersuchung der humoralen Immunität wählten wir die Methodik der indirekten Membranimmunfluoreszenz. Da mit lebenden Zellen gearbeitet wird, eignet sich diese Technik besonders gut zum Studium antigener Determinaten auf der Zelloberfläche. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Empfindlichkeit des Tests im Vergleich zu anderen immunologischen Verfahren.
2. a) Die Gesamtlymphozytenzahl wurde aus der Leukozytenzahl/ μ l und dem prozentualen Lymphozytenanteil im Differentialblutbild bestimmt.

Die T-Lymphozyten wurden nach der Rosettenmethode, die B-Lymphozyten in direkter Immunfluoreszenz bestimmt.
- b) Die Suppressor-Zell-Aktivität wurde untersucht nach dem Verfahren von Shou und Mitarbeitern (128) und der Modifikation durch Hammer, Jerry und Lewis (63).

2. P A T I E N T E N G U T =====

In die Untersuchungen wurden 42 Blasen- und 35 Nieren-Karzinom-Patienten einbezogen, die sich im Zeitraum Februar 1978-Juni 1980 in der Urologischen Universitätsklinik München in Behandlung befanden.

2.1. Blasen-Ca-Patienten (siehe Tab. 1)

Den 40 Blasen-Karzinom-Patienten, histologisch alle Urothel-Karzinome, wurden auch zwei Patienten mit Nierenbeckenkarzinom, ebenfalls histologisch Urothelkarzinome, zugeordnet. Bei zwei Patienten fand sich eine Tumorlokalisation sowohl im Nierenbecken als auch in der Blase. Zwei Patienten litten gleichzeitig an einem Prostata-Ca, ein Patient an einem Prostata-Ca und an einer Chronisch-Lymphatischen Leukämie. Drei Patientinnen wurden früher auf Grund eines Uteruskarzinoms bestrahlt.

Die Therapie der Wahl bei den meisten Patienten (38) war die Transurethrale Resektion (TUR) des Tumors, bei den zwei Patienten mit Vorkommen des Tumors in Blase und Nierenbecken in einer TUR und einer Tumornephrektomie, bei den zwei Patienten mit alleinigem Nierenbeckentumor in einer Tumornephrektomie. Drei Patienten sind zwischenzeitlich unseres Wissens an ihrem Tumorleiden gestorben. Bei nahezu der Hälfte unserer Patienten (20) handelt es sich um ein Rezidiv eines schon früher diagnostizierten und behandelten Tumors, bei 22 wurde die Diagnose erstmals gestellt.

LISTE DER BLASIN-KARZINOM-PATIENTEN

Name	Alter	Geschlecht/ verstorben	Tumorstadium	Rezidiv ?	Therapie TUR TN	Tests:		
						IF: CY:	SZA: IX:	Andere Malignome
Gruppe I.								
1. W.K.	60	W	Tis NO MO G0	X	X	X	X	
2. H.W.	69	W	"	X	X	X	X	
3. K.W.	65	M	"	-	X	X	X	
4. T.R.	71	M	"	-	X	X	X	
5. L.M.	46	W	Tis NO MO G1	X	X	X	X	
6. B.J.	50	M	"	-	X	X	X	
7. L.A.	72	M	"	-	X	X	X	
8. M.G.	69	M	"	X	X	X	X	
9. H.W.	71	M	"	-	X	X	X	
10. N.E.	72	M	"	X	X	X	X	
11. S.M.	72	M	"	-	X	X	X	
12. K.M.	70	M	"	X	X	X	X	Prostata-Ca
13. H.J.	71	M	"	-	X	X	X	
14. R.R.	76	W	"	-	X	X	X	Uterus-Ca
15. K.E.	20	W	"	-	X	X	X	
16. S.J.	76	M	"	X	X	X	X	Prostata-Ca, Chronisch Lymphatische Leukämie
17. D.D.	39	M	"	-	X	X	X	
18. K.J.	84	M	"	-	X	X	X	
19. M.H.	61	M	Tis NO MO C2	-	X	X	X	

Gruppe II.

20.	T.W.	68	M	T1 N1 MO G2	-	x	x	x	
21.	B.F.	49	M	T2 NO MO G1	-	x	x	x	
22.	P.H.	68	M	" " G2	-	x	x	x	
23.	L.G.	55	W	" " G3	-	x	x	x	
24.	L.H.	66	M	" " G3	x	x	x	x	
25.	L.W.	71	M	" " G2	-	x	x	x	
26.	E.T.	66	W	" " G3	-	x	x	x	
27.	K.J.	80	M	" " G2	-	x	x	x	
28.	M.A.	65	M	T2 N2 MO G2	x	x	x	x	
29.	L.F.	63	M	" " G3	-	x	x	x	
30.	R.W.	56	M	T3 NO MO G2	x	x	x	x	
31.	F.J.	56	M	" " G3	x	x	x	x	

Gruppe III.

32.	K.M.	75	M	T4 Nx Mx G3	x	x			Prostata-Ca
33.	D.I.	65	W	" " G3	-	x	x		
34.	P.J.	71	W	" " G3	-	x	x		Uterus-Ca
35.	M.J.	74	I.	" " G3	x	x	x		
36.	L.A.	70	W	" " G3	x	x	x		
37.	M.T.	58	W	T4 N1-3fxG3	x	x	x		
38.	R.C.	64	M	" " G3	x	x	x		
39.	G.C.	66	M +	T4 N1-3M1G3	x	x	x		
40.	S.H.	84	M +	" " G2	x	x	x		
41.	F.J.	66	M +	T2 N1-3M1G3	x	x	x		
42.	F.C.	69	W	" " G3	x	x	x		

TUP = Transurethrale Resektion

TN = Tumor-Nephrektomie

IR = Immunfluoreszenz

ZY = Zytologie

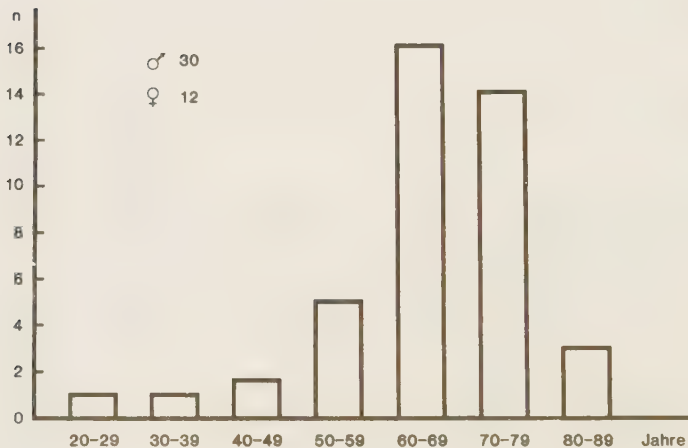
SZA = Suppressor-Zell-Aktivität

LY = Lymphozyten-Bestimmung

Tab. 1: Die Liste der Blasen-Ca-Patienten führt für jeden Patienten Alter, Geschlecht, Tumorstadium und -grad und Therapie an; ferner, ob es sich um ein Rezidiv oder einen Ersttumor handelt, welche Tests bei welchen Patienten durchgeführt wurden und welche anderen malignen Tumoren bekannt waren.

Unsere Patientenliste zeigt zusätzlich, welche Tests bei welchen Patienten durchgeführt wurden (Tab. 1).

Tabelle 2 zeigt die Alters- und Geschlechtsverteilung unserer Blasen-Ca-Patienten, die dem in der Literatur beschriebenen Patientengut (5) entspricht. Männer sind deutlich in der Überzahl, das Verhältnis männlich zu weiblich beträgt 2,5:1.



Tab. 2: Altersverteilung
unserer Blasen-Ca-Patienten

Zur Tumorstadien-Einteilung findet das TNM-Schema Verwendung (siehe S.39). Die Verteilung unserer Patienten auf die Stadien Tis-T4 und auf die histologischen Gradeinteilungen G1-3 ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

n = 42	G0	G1	G2	G3
Tis	4	14	1	-
T1	-	-	1	-
T2	-	1	4	6
T3	-	-	1	1
T4	-	-	1	8

Tab. 3: Blasen-Ca-Patienten: Klinisches Stadium
und histologische Gradeinteilung

Für die Indirekte Immunfluoreszenz teilen wir die Patienten in drei Gruppen ein:

- Gruppe I = Tis NO MO: Es handelt sich hier um die Tumoren, bei denen die Basalmembran noch intakt ist.
n=19 Vom histologischen Grading her betrachtet hatten vier Patienten ein Papillom (G0) und 15 ein Ca in situ (davon 14 G1 und G2).
- Gruppe II = T1-3 NO-3 MO: In dieser Gruppe werden die Tumoren zusammengefaßt, die in ihrer lokalen Ausdehnung noch auf die Blasenwand beschränkt sind. In 2 Fällen wurden auch schon Absiedelungen in die regionalen Lymphknoten, aber noch keine Fernmetastasen entdeckt. Das histologische Grading ergab 1xG1, 6xG2 und 5xG3.
- Gruppe III = T4 oder M1: Die Karzinome haben hier entweder die Blasenwand schon durchdrungen oder Fernmetastasen gesetzt. Nur in einem Fall ist hier ein G2-Tumor beobachtet worden, die restlichen entsprachen einem entdifferenzierten Urothel-Ca G3.

Da die n-Zahl der Patienten, bei denen die Suppressor-Zell-Aktivität gemessen wurde, geringer ist, werden diese nur in 2 Gruppen eingeteilt:

Gruppe A = Tis-2 NO MO: Patienten ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen.

Gruppe B = T3-4 N1-3/M1: Patienten, deren Tumor sich entweder lokal schon weit entwickelt oder Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen gesetzt hat.

2.2. Nieren-Ca-Patienten (siehe Tab. 4)

Histologisch handelt es sich bei allen 35 Patienten um ein Nieren-Zell-Karzinom, früher auch Hypernephrom genannt.

Die Therapie bestand in 30 Fällen in einer Tumor-Nephrektomie mit Lymphadenektomie, bei 5 Patienten mit fortgeschrittenem Tumor wurde eine Embolisation der Arteria renalis durchgeführt. Unseres Wissens verstarben bisher drei Patienten an ihrem fortgeschrittenem Tumor.

Auch bei den Nieren-Ca-Patienten handelt es sich häufiger um Männer (22) als um Frauen (13); das Verhältnis männlich zu weiblich war 1,7:1, was durchaus der allgemein beobachteten Verteilung entspricht. Gleiches gilt für die Altersverteilung (siehe Tab. 5).

LISTE DER NIEREN-KARZINOM-PATIENTEN

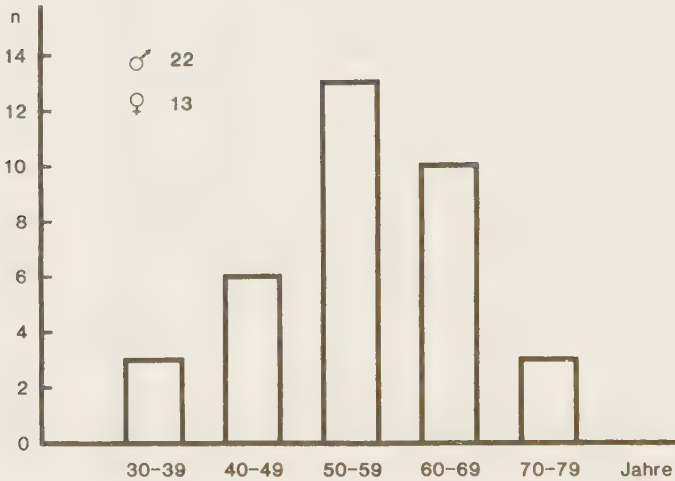
Name	Alter	Geschlecht/ verstorben	Tumorstadium	Therapie		IF:	Tests:		LY:
				TN	Emb		SZA:		
Gruppe I.									
1. D.H.	55	W	T1 NO MO G3	x		x			
2. G.H.	74	M	" " G2	x		x		x	x
3. I.O.	55	M	" " G2	x		x		x	x
4. E.A.	59	W	" " G1	x					x
5. K.G.	47	M	T2 NO MO G2	x		x			
6. S.J.	40	M	" " G1	x		x			
7. N.M.	76	W	" " G2	x		x			x
8. F.S.	64	W	" " G2	x		x			x
9. M.G.	62	W	" " G2	x		x			x
10. H.L.	68	W	" " G3	x		x			
11. D.E.	38	W	" " G3	x		x			x
12. L.R.	36	M	" " G2	x		x			x
13. M.R.	55	M	" " C2	x		x			x
14. H.G.	62	M +	" " G1	x		x		x	x
15. R.H.	45	M	" " G1	x		x		x	x
16. M.P.	63	M	" " G2	x		x		x	x
17. K.A.	53	M	" " G2	x		x			x
18. S.G.	57	M	T3 NO MO G3	x		x		x	x
19. B.A.	53	M	" " G3	x		x		x	x

Gruppe II.

20. N.M.	57	W	T2 N1 MO G2	x	x	x
21. S.H.	57	W	T2 N3 MO G2	x		
22. K.W.	52	W	T2 Nx M1 G2	x		
23. N.A.	56	M +	" " G2	x		
24. Z.H.	41	M	T3 N1-3 G2	x	x	x
25. S.F.	39	M	" MO G2	x	x	
26. P.T.	53	W	" " G2	x	x	
27. H.R.	62	M	" " G2	x	x	
28. W.E.	59	M	T3 N1-3M1G2	x	x	x
29. G.K.	61	M	" " G3	x	x	x
30. N.R.	45	M	" " Gx	x		
31. N.W.	64	M	" " Gx	x	x	x
32. B.R.	47	M	T4 N1-3M1G2	x		
33. S.F.	67	M +	" " Gx		x	x
34. E.W.	66	W	" " Gx		x	x
35. H.E.	75	W	" " Gx		x	x

TN = Tumor-Nephrektomie
 Emb = Embolisation der A. renalis
 IF = Immunfluoreszenz
 SZA = Suppressor-Zell-Aktivität
 LY = Lymphozytenbestimmung

Tab. 4: Die Liste der Nieren-Ca-Patienten führt für jeden Patienten Alter, Geschlecht, Tumorstadium und -grad und Therapie an; ferner, welche Tests bei welchen Patienten durchgeführt wurden.



Tab. 5: Altersverteilung
unserer Nieren-Ca-Patienten

Auch hier ist in der Patientenliste (Tab. 4) vermerkt, welche Tests bei welchen Patienten durchgeführt wurden.

Die Einteilung der Patienten in Tumorstadien erfolgt wiederum nach dem TNM-Schema (siehe S.44). Wie sich unsere Patienten auf die verschiedenen T- und G-Gruppen verteilen, zeigt Tab. 6.

n = 35	G1	G2	G3	Gx
T1	1	2	1	-
T2	3	12	2	-
T3	-	5	3	2
T4	-	1	-	3

Tab. 6: Nieren-Ca-Patienten: Klinisches Stadium
und histologische Gradeinteilung

Wir unterteilen die Patienten für die Untersuchungen in zwei Gruppen:

Gruppe I = T1-3 NO MO: Tumoren ohne nachweisbare Metastasen
n=19

Gruppe II = T4/N1-3 oder M1: Hier werden die Patienten zusammen-
n=16 gefaßt, bei denen entweder Lymph-
knoten- oder Fernmetastasen gefunden
worden sind oder bei denen der Tumor

lokal schon als T4 eingestuft werden muß.

Keine großen Unterschiede zwischen beiden Gruppen bietet die histologische Gradeinteilung:

Gruppe I : 4 x G1, 10 x G2, 5 x G3

Gruppe II : - x G1, 10 x G2, 1 x G3, 5 x Gx¹

¹ = Gx bedeutet: Histologisches Grading nicht möglich, da Patient nicht operiert wurde.

2.3. Vergleichspatienten (siehe Tab. 7)

In den einzelnen Testen werden verschiedene Patientengruppen mit benignen urologischen Erkrankungen zu Vergleichszwecken mit den Karzinompatienten herangezogen. In den meisten Fällen handelt es sich um Patienten mit Zystitis, darunter auch Personen, die früher wegen eines Blasenkarzinoms behandelt worden und derzeit rezidivfrei sind.

Das Durchschnittsalter (59) liegt zwischen dem Alter der Nieren-Ca-Patienten (56) und dem der Blasen-Ca-Patienten (65). Die Diagnosen sind aus der Tab. 7 ersichtlich, ebenso, bei welchen Personen welche Tests durchgeführt worden sind.

Die in der Tabelle 7 mit + bezeichneten Personen tauchen auch in der Liste der Blasen-Ca-Patienten auf, zu der Zeit, als sie wegen

ihres Tumors in der Klinik waren.

In die Liste der Vergleichspersonen wurden sie aufgenommen, als sie anlässlich einer Nachkontrolle tumorfrei waren und lediglich eine unspezifische Zystitis aufwiesen.

Bei den "Normalpersonen", die bei der Messung der Suppressorzell-Aktivität als Vergleichsgruppe dienen und deren Seren bei der Immunfluoreszenz Verwendung gefunden haben, handelt es sich um Institutsmitglieder ohne Malignom oder entzündliche Erkrankung.

LISTE DER VERGLEICHSPERSONEN

Name	Alter	Geschlecht	Diagnose	Tests:			
				IF	SY	SZA	IV
1. I.M.	46	W	derzeit rezidivfrei, Zystitis	x			
2. M.G. +	69	M	"	x		x	
3. R.W. +	57	M	"	x			
4. K.J. +	80	M	"		x		
5. B.A.	78	M	"		x		
6. S.B.	71	M	"		x		
7. E.A. +	76	W	"		x		
8. H.B.	70	W	"			x	x
9. A.R.	71	W	"			x	x
10. S.A.	63	M	Chronische Zystitis			x	x
11. S.B.	33	W	Zystitis, Nephrolithiasis		x	x	x
12. S.S.	48	W	Chronische ulzeröse Zystitis		x	x	x
13. C.D.	36	W	Zystitis, Urethrasenose		x	x	x
14. C.C.	66	W	Radiatio-Zystitis (wegen Uterus-Ca)		x	x	x
15. B.J.	36	M	Zystitis glandularis, v.-Brunn'sche Zellnester		x		
16. M.K.	38	M	Phäochromozytom				
17. L.W. +	71	M	derzeit rezidivfrei, Zystitis		x		x

Durchschnittsalter: Gesamt: 59, in den Tests: 57 55 65 64

Abkürzungen siehe unter Listen von Karzinom-Patienten

Tab. 7:

Die Liste der Vergleichspersonen führt für jede Person Alter, Geschlecht und Diagnose an; außerdem, welche Tests bei welchen Personen durchgeführt wurden.

2.4. MATERIAL VON PATIENTEN

1. Tumorgewebe

Das in der Indirekten Immunfluoreszenz verwendete Tumorgewebe von Blasenkarzinomen wurde bei transurethralen Resektionen entnommen. Histologisch handelte es sich bei allen Proben um ein Urothelkarzinom.

Das Nierenkarzinomgewebe wurde uns vom Pathologen aus einem möglichst vitalen, nicht nekrotischen Tumorbezirk herausgeschnitten und in physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt. Nierenbeckenkarzinome, die histologisch einem Urothelkarzinom entsprachen, wurden den Blasenkarzinomen zugerechnet.

2. "Normales" Gewebe

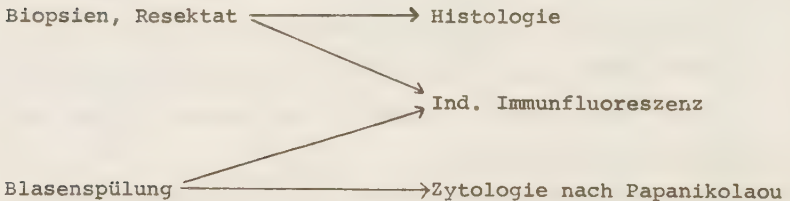
- a) Urothel: Es handelt sich hierbei um Biopsien, die anlässlich eines "Mappings" der Blasenschleimhaut entnommen wurden. Sie wurden ebenfalls in physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt. Histologisch entsprachen sie normalem Urothel ohne Anhalt für Malignität.
- b) Niere: Das als "Normalniere" verwendete Gewebe für die Vergleichsgruppe entnahm der Pathologe dem Tumornephrektomie-Präparat aus dem ihm makroskopisch normal erscheinenden Nierenparenchym.

3. Blasenspülung für Zytologie

Die Blasenspülung wurde von den Urologen im Anschluß an eine Zystoskopie mit physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen. Dabei

wird ein Dreiweg-Spülkatheder unter streng aseptischen Kautelen in die Blase eingeführt. Die Spülflüssigkeit wird über einen Weg in die Blase eingebracht und verläßt sie auf einem zweiten Weg wieder. Der dritte Weg dient zum Aufblocken des Ballons an der Kathederspitze, der denselben in der Blase plaziert halten soll. Ein Teil der Lösung wurde für die zytologische Untersuchung, der andere Teil für die Immunfluoreszenz verwendet.

Mit diesem Patientenmaterial wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:



4. Serum für die Immunfluoreszenz

Von den Patienten mit Urothel- und Nierenkarzinomen sowie von den Vergleichspersonen erhielten wir venöses Vollblut ohne Zusatz von Gerinnungshemmern. Es wurde 20 min bei

3000 U/min zentrifugiert und das Serum als Überstand gewonnen. Die Seren wurden für spätere Tests als autologe und allogene Vergleichsseren bei -20°C aufbewahrt.

5. Heparinisiertes Vollblut zur Lymphozytengewinnung

Die Gerinnung von 10 ml Vollblut wurde mit 0,1 ml eines stabilisatorfreien Heparins¹, das in einer Spritze aufgezogen war, verhindert.

¹=Thrombophob^R, 25000 U.S.P.-E. Heparin-Na in 5 ml, stabilisatorfrei, Nordmark-Werke, Hamburg

3.1. ZUR KLINIK DES BLASEN-KARZINOMS

=====

Das Blasen-Ca macht etwa 3 % aller bösartigen Tumore aus. Die Altersverteilung läßt einen Gipfel vom 60.-80. Lebensjahr erkennen.

Die Geschlechtsverteilung lautet 3:1 = Männer:Frauen.

Ätiologie:

Raucher haben ein um das vierfache gesteigertes Risiko, an einem Blasen-Ca zu erkranken; dies wird auf Tryptophanmetabolite im Urin zurückgeführt. Eine Reihe weiterer Stoffe wird angeschuldigt karzinogen auf die Blasenschleimhaut einzuwirken. So führt zum Beispiel Beta-Naphthylamin bei Arbeitern der Farbstoff- und Gummiindustrie zu einer hohen Inzidenzrate von Blasen-Ca. Ebenso wirken Arsen (Winzer!), Anilinfarbstoffe und Benzidin ckarzinogen auf das Blasenurothel. Die Geschlechtsverteilung zugunsten der Männer erklärt sich daraus, daß Urinkarzinogene beim Mann wegen der in diesem Alter häufig vorhandenen Prostataadenom-Miktionsstörung eine längere Einwirkungsmöglichkeit auf das Urothel haben.

Histopathologie (nach 5,15)

Die in der Blase gefundenen Tumoren zeigen folgende Verteilung: 10 % Papillome, die heute allerdings nicht mehr als gutartige, eigständige Tumorart angesehen werden, sondern unter dem histologischen Differenzierungsgrad G0 als Präkanzerose zum

Urothel-Karzinom gerechnet werden.

85 % Urothel-Karzinome, davon 40 % Karzinomata in situ

3 % Plattenepithel-Karzinom

2 % Adeno-Karzinom

Alle anderen Tumorarten oder Metastasen sind Raritäten.

Die Urothel-Karzinome sind häufig papillär gebaut, können aber auch flach solide entwickelt sein. Sie ulzerieren und können frühzeitig die Blasenwand infiltrieren. Vielfach entstehen Papillome und Karzinome multipel an verschiedenen Stellen der Blase, der Harnleiter und des Nierenbeckens gleichzeitig, offenbar bedingt durch die chemischen Karzinogene, die an allen Stellen des Urothels wirksam werden können.

Der intramurale Abschnitt des Blasentumors zeigt regelmäßig einen höheren Malignitätsgrad. Dies unterstreicht die Bedeutung der histopathologischen Untersuchung der tiefen Blasenwandabschnitte. Die papilläre Struktur des Tumors geht bei der Infiltration verloren. Die aus dem Übergangsepithel hervorgegangenen Tumorzellen wachsen in breiten, soliden Strängen.

Das Plattenepithel-Karzinom entwickelt sich häufig aus Metaplasien und Leukoplakien, der Tumor erscheint solide, nichtpapillär-gestielt.

Aus den von-Brunschen Zellnestern entwickelt sich das metaplasio-gene Adenokarzinom. Es wächst tief infiltrierend, selten exophytisch, mikroskopisch besteht der Tumor aus typischen Acini mit kubischen Zellen.

Symptomatik:

Bei weitem das häufigste Erstsymptom ist die Hämaturie, typischerweise schmerzlos, die aber nicht ein Frühsymptom sein muß, da keine konstante Beziehung zwischen Blutung und Tumorgroße besteht. Daneben kommen auch noch dysurische Beschwerden vor, d.h. unangenehme bis schmerzhafte Miktion, nächtlicher Harndrang oder erhöhte Miktionsfrequenz.

Diagnostik:

Jede schmerzlose Hämaturie sollte Anlaß zu einer Zystoskopie sein, v.a. bei Patienten über 40 Jahren, wenn das Beschwerdebild nicht für eine entzündliche Erkrankung spricht.

Als zweites sollte der Urinschleudersatz zytologisch mit der Papanikolaou-Färbung auf Tumorzellen untersucht werden. Die Trefferquote dieser Methode beträgt etwa 85 %. Falsch negative Ergebnisse können unter anderem von Zellen hochdifferenzierter, nicht infiltrierender Blasentumoren, die sich nur wenig vom normalen Urothel unterscheiden, herrühren. Falsch positive Ergebnisse können vorgetäuscht werden durch regenerierendes Urothel nach vorausgegangenen Resektionen, Entzündungen, Bestrahlungen oder Chemotherapie.

Bei allen Blasen-Karzinom-Patienten wird ein Ausscheidungs-Urogramm durchgeführt, um die Funktion der Nieren zu überprüfen, eine evtl. durch den Tumor verursachte Erweiterung von Harnleiter und Nierenbecken festzustellen und multilokuläre Tumoren in diesen Organen zu suchen.

In Narkose erfolgt dann die bimanuelle Untersuchung des Tumors auf Beweglichkeit, Größe und Beziehung zu den Nachbarorganen. Eine alleinige Biopsie ohne gleichzeitige Resektion wird nur bei inoperablen Patienten oder tumorverdächtigen Arealen gemacht. Bei diesem sogenannten "Mapping" werden Gewebeproben aus verschiedenen Blasenquadranten entnommen. Auch wenn in der Zytologie pathologische Zellen nachgewiesen werden, führt man Probeexzisionen aus verdächtigen Arealen durch.

Lymphknotenmetastasen können ab einer bestimmten Größe mit der Lymphographie nachgewiesen werden, wobei sich allerdings die besonders wichtigen obturatorischen Lymphknoten nicht darstellen lassen.

Therapie:

Sie besteht in den meisten Fällen in der transurethralen Resektion mit der Elektroschlinge. Im Stadium Tis oder T1-3 hat sie durchaus kurativen, bei T4 nur palliativen Charakter. In den Stadien T2-3 wird auch eine radikale Zystektomie mit suprapubischer Harnableitung, v.a. bei multilokulär vorkommenden Tumoren ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen durchgeführt. Nach einer transurethralen Resektion kann auch noch die Laserkoagulation des Tumorgundes angeschlossen werden.

Bei allen Stadien werden wegen der hohen Rezidivrate Kontrollen durchgeführt, deren Zeitabschnitte sich nach dem jeweiligen Malignitätsgrad richten sollten.

Chemotherapie und Radiatio bringen als Monotherapie keine

befriedigenden Ergebnisse, sie werden in den meisten Fällen mit dem operativen Vorgehen verbunden. Die Chemotherapie erfolgt als lokale Instillationsbehandlung als adjunktive Therapie zur TUR, aber auch systemisch in hohen Tumorstadien. Das Nierenbecken-Urothel-Karzinom wird durch Nephrektomie und Lymphadenektomie therapiert.

Prognose:

Habegger u.a. (59) beobachteten 204 Patienten, die alle einer TUR mit mindestens halbjährlicher Kontrolle, einschließlich eventueller Nachresektionen, unterzogen worden waren, über mehr als 5 Jahre und stellte eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 54,4 % fest. Die Stadieneinteilung spielte für die Prognose die entscheidende Rolle (siehe Tab. 8): Während von Patienten im Stadium Tis alle und T1 89,4 % überlebten, sanken die Chancen in den Stadien T2 auf 51 % und in T3 auf 22,5 %. Von den Patienten im Stadium T4 lebte keiner länger als zwei Jahre.

STADIUM	%	GRAD	%
Tis	100,0	G1	87,5
T1	89,4	G2	75,0
T2	51,0	G3	31,0
T3	22,5		
T4	0		

Tab. 8: Fünf-Jahres-Überlebensrate von Blasenkarzinompatienten verschiedener Stadien- und Gradeinteilungen (nach Habegger, 59)

Auch in der histologischen Gradeinteilung gab es ein deutliches Gefälle: Die Fünf-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit hoch- und mitteldifferenziertem Karzinom betrug 87,5 % bzw. 75 % und sank bei niederdifferenzierten Karzinomen (G3) auf 31 %.

Weiterhin wurde in dieser Studie die Rezidivhäufigkeit des Urothelkarzinoms untersucht (Tab. 9). Von den 111 Patienten, die fünf Jahre überlebten, erlitten im 1. Jahr nach Behandlungsbeginn 33 %, im 2. Jahr 24,3 % und im dritten Jahr schließlich nur noch 7,2 % ein Rezidiv. Die Rezidivhäufigkeit wurde also mit zunehmender Überlebenszeit geringer, auch wenn vorher ein oder mehrere Rezidive transurethral entfernt werden mußten.

Die Tatsache der hohen lokalen Rezidivneigung in den ersten Jahren nach Primärbehandlung unterstreicht die enorme Wichtigkeit viertel- bis halbjährlicher Kontrollen in diesem Zeitraum.

STADIUM	n	JAHRE NACH ERSTOPERATION				
		1	2	3	4	5
Tis	2	1	1	-	-	-
T1	76	24	16	5	1	-
T2	24	9	6	2	-	1
T3	9	3	4	1	-	-
GESAMT	111	37	27	8	1	1
%		33,3	24,3	7,2	0,9	0,9

Tab. 9: Tumorrezidive bei Patienten mit mehr als 5 Jahren Überlebenszeit (nach Habegger, 59)

Stadieneinteilung nach dem TNM-System (147):

a) postoperativ-histologisch festgestellte Ausdehnung des Tumors:

- Tis (=O): Karzinom in situ, Tumor auf Mucosa beschränkt
T 1 (=A) Tumor geht nicht über Lamina propria hinaus
T 2 (=B1): Befall der oberflächlichen Muskulatur der Blasenwand
T 3 (=B2,C): Befall der tiefen Muskulatur bzw. der ganzen " "
T 4 (=D): Tumor geht über Blasenwand hinaus, Befall von Nachbarorganen.

Einteilung O,A,B,C,D entspricht der alten Jewett-Marshall-Nomenklatur

b) histologische Gradeinteilung (=Grading):

- G 0: kein Anhalt für Malignität, Papillom
G 1: hochdifferenziertes Karzinom = geringe Malignität
G 2: mitteldifferenziertes Karzinom = mittlere Malignität
G 3: niederdifferenziertes Karzinom = hohe Malignität
G x: keine Histologie bekannt

c) Lymphknotenmetastasen:

- N 0: kein Nachweis eines Lymphknotenbefalls
N 1: Befall eines einzigen homolateralen, regionalen Lymphknotens
N 2: Befall mehrerer regionaler oder kontralateraler Lymphknoten
N 3: Fixierte regionale Lymphknoten (setzt chir. Exploration voraus)
N 4: Befall iuxta regionaler Lymphknoten

d) Fernmetastasen:

- M 0: keine Fernmetastasen nachweisbar
M 1: Fernmetastasen nachgewiesen

3.2. ZUR KLINIK DES NIEREN - KARZINOMS

Das Nierenzell-Karzinom macht etwa 1 % aller Malignome aus, kommt am häufigsten im 6. Lebensjahrzehnt vor und hat eine Geschlechtsverteilung von m:w = 2:1.

Ätiologie:

Das früher als Hypernephrom bezeichnete Nierenzell-Karzinom hat eine weitgehend unbekannte Ätiologie, es wird angenommen, daß es sich aus einem gutartigen Adenom entwickelt, das aber wegen seiner Symptomarmut nur selten frühzeitig entdeckt wird. Das Auftreten von Kreuzreaktionen zwischen Tubulusantigenen und Tumorantigenen, die bei Reaktion eines Antiserums gegen Tumormembranen beobachtet wurden, sprechen dafür, daß sich das Nierenzell-Karzinom aus entarteten Tubuluszellen entwickelt (125).

Histopathologie (nach 5,15)

Das Nierenzell-Karzinom besteht meistens aus besonders gut differenzierten Zellen mit hellem, oft pflanzenzellartigem Zytoplasma, das lipoid- und glykogenreich ist. Makroskopisch fällt der Tumor durch sein buntes Aussehen auf (graugelb und rot); die gelbe Farbe rührt vom Lipoidreichtum, die rote von Blutungen aus den Tumorgefäßen in das Tumorparenchym her. Die Grenze zum Nierenparenchym kann scharf sein, d.h. der Tumor kann zunächst verdrängend wachsen. Nierenzell-Karzinome haben die

Tendenz, sowohl in das Nierenbecken als auch in die Vena renalis einzubrechen.

4/5 aller Nierentumoren im Erwachsenenalter sind Nierenzell-Karzinome, wie eben beschrieben, der Rest verteilt sich auf mesenchymale Tumore:

Fibrome, Myome, Lipome bzw. -sarkome, Mischtumoren wie z.B. das Angiomyolipom und Adenome.

Symptomatik:

Die "klassische" Trias: Flankenschmerz, Hämaturie, palpabler Tumor findet sich nur in etwa 10 % aller Fälle (76). Meist führt nur ein einziges dieser Symptome auf die richtige Spur, wobei man leider feststellen muß, daß alle 3 Symptome schon Zeichen eines fortgeschrittenen Tumors sind. Häufig führen jedoch auch ganz andere Symptome zur Diagnose: eine ungeklärte BKS-Erhöhung, uncharakteristische Bauchbeschwerden, Metastasensymptomatik oder ein Zufallsbefund bei einer internistischen Durchuntersuchung.

Als paraneoplastische Symptome treten nicht ganz selten beim Nieren-Karzinom auf: eine Hypertonie, erhöhtes Plasmarenin, eine Polyglobulie, erhöhtes Erythropoetin, oder auch das Stauffer-Syndrom, eine Leberdysfunktion mit Alpha-2-Hyperglobulie, erhöhte alkalische Phosphatase und Hyperprothrombinämie. Eine Hypercalcämie kann durch Metastasen oder durch ektope Bildung einer Parathormon-ähnlichen Substanz im Tumor bedingt sein.

Diagnostik:

Die radiologische Untersuchung steht ganz im Vordergrund. Differentialdiagnostisch ist vor allem eine Nierenzyste abzugrenzen. Ein gutartiger Tumor läßt sich meist erst intraoperativ durch histologische Schnellschnitt-Untersuchung abklären.

1. Schon auf einer Abdomenleeraufnahme läßt sich häufig eine über die normale Nierenkontur hinausgehende Verschattung feststellen. In 10 % finden sich Verkalkungen.
2. Im Ausscheidungsurogramm weisen eine Vorbuckelung der Konturen und eine Verdrängung des Kelchsystems auf einen Tumor hin. Schichtaufnahmen erlauben oft eine exakte Beurteilung ohne Darmgasüberlagerung.
3. Das Angiogramm der Niere läßt pathologische Gefäße und somit einen Tumor mit einer Genauigkeit von 95 % erkennen.
4. Die Lymphographie kann vorhandene Lymphknotenmetastasen nachweisen.
5. Die Kavographie soll klären, ob der Tumor in die Nierenvene oder Vena cava vorgewachsen ist.
6. Die Nierensequenz-Szintigraphie dient der Beurteilung der Funktionsfähigkeit, vor allem der nicht befallenen Niere.
7. Ein Computertomogramm kann die Frage Tumor/Zyste klären.
8. Zur Metastasendiagnostik wird ein Thorax-Röntgenbild, ein Knochen- und Leberszintigramm herangezogen.

Metastasen:

Das Nieren-Karzinom gehört zu den Tumoren, die bevorzugt in das Skelett metastasieren, daneben kommen aber auch Absiedelungen in Lunge, Leber und andere Organe vor.

Therapie:

1. Therapie der Wahl ist bei intakter Restniere die radikale Tumor-Nephrektomie von einem thorako-abdominellen Zugang aus, einschließlich Fettkapsel, Nebenniere und regionaler Lymphknoten bei T1-4 und auch noch bei Einzelmetastasen, die ebenfalls exzidiert werden.
2. Radiotherapie: Sie dient der präoperativen Tumorverkleinerung bzw. der postoperativen Nachbestrahlung bei Verdacht auf zurückgebliebene Tumoranteile.
3. Bei Metastasierung wird eine Hormontherapie mit Gestagenen oder Androgenen versucht, auf die jedoch nur ein geringer Teil der Patienten anspricht. Der allgemein gut roborierende und psychotrope Effekt bedeuten eine eindeutige Verbesserung. Eine Chemotherapie zeigt derzeit keine Erfolge.
4. Bei inoperablen Tumoren wird mit dem Gewebeklebstoff Histoacryl die Arteria renalis embolisiert. Dadurch erreicht man gelegentlich lokale Schmerzfreiheit, Tumorregression und Metastasenrückbildung.

Als Nebenwirkung kann aber auch das Post-Embolisationssyndrom auftreten mit Schmerzen, Fieber und Erbrechen.

Prognose:

Die mittlere Fünfjahres-Überlebensrate beträgt, alle Stadien zusammengefaßt, derzeit etwa 49 % (5), 10 Jahre nach Diagnosestellung und optimaler Therapie leben noch 28 % der Patienten. Patienten, deren Tumor dem histologischen Grad G1 zugerechnet wurde, schnitten mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 40 % deutlich besser ab als Patienten mit einem G3-Tumor (18 %). Bei nachgewiesener Fernmetastasierung beträgt die Überlebensdauer selten mehr als zwei Jahre.

Stadieneinteilung nach dem TNM-System (147):

- T1: Kleiner Tumor, ohne Nierenvergrößerung, umgeben von gesundem Nierenparenchym, mit geringer Kelchverformung
- T2: Tumor mit Vergrößerung der Niere, oder Einbeziehung des Kelchsystems, Cortex-Kontinuität erhalten
- T3: Ausdehnung ins Nierenfettgewebe oder Einbruch in die Hilusgefäße
- T4: Befall benachbarter Organe oder der Bauchwand

Histologisches Grading:

- G0: kein Anhalt für Malignität, Adenom
- G1: hochdifferenziertes Karzinom = geringe Malignität
- G2: mitteldifferenziertes Karzinom = mittlere Malignität
- G3: niederdifferenziertes Karzinom = hohe Malignität
- Gx: Histologie nicht bekannt

Lymphknotenmetastasen:

NO: kein Nachweis eines Lymphknotenbefalls

N1: Befall eines einzigen, homolateralen, regionalen Lymphknotens

N2: Befall mehrerer regionaler oder kontralateraler Lymphknoten

N3: Fixierte regionale Lymphknoten (setzt chirurgische Exploration voraus)

N4: Befall iuxtaregionaler Lymphknoten

Fernmetastasen:

MO: keine Fernmetastasen nachweisbar

M1: Fernmetastasen nachgewiesen

4. M E T H O D I K

4.1. I N D I R E K T E I M M U N F L U O R E S Z E N Z =====

Unser Testsystem basiert auf Philipps u.a. (118), "A system of immunefluorescence in the study of tumor-cells" und auf Wick (152), "Immunfluoreszenz".

1. Präparation des Gewebes und der Blasenspülung zu einer Einzelzellsuppression

Tumorgewebe und Blasenspülungen wurden so schnell wie möglich noch am Tage des operativen Eingriffs aufgearbeitet, um möglichst viele vitale Zellen zu erhalten. Die Gewebestückchen wurden mechanisch mit Skalpelli oder Nadeln in Petrischalen zerkleinert (Blasen-, Nierentumor, normales Gewebe). Die Blasenspülflüssigkeit wurde abzentrifugiert¹ (1200 U/min, 10 min) und der Bodensatz in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert.

Diese Zellsuspensionen wurden nun mit einer Pasteurpipette² in ein Reagenzglas übertragen und in NaCl gewaschen und danach 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, d.h. mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, und die Zellen, die sich am Boden abgesetzt hatten, erneut in Kochsalzlösung suspendiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

¹ = Hettich-Zentrifuge Rotanta K, F. Hettich, Tuttlingen

² = Fa. John Poulten Ltd., Barking-Essex-England

2. Inkubation mit autologen und allogenen Seren

Die aufbereiteten Zellen aus Tumor oder Blasenspülung wurden mit verschiedenen Patientenseren versetzt, um eine immunologische Reaktion zwischen den Zellen (=Antigen) und eventuell im Serum vorhandenen Antikörpern herbeizuführen. Zu diesem Zweck wurden die Seren zunächst 1:10 mit Kochsalzlösung verdünnt. Bei dieser Verdünnung sollen unspezifische Reaktionen durch verschiedene andere Serumproteine mit den Zellantigenen vermieden werden (152).

Drei Tropfen Zellsuspension (10^6 Zellen) wurden mit 50-100 µl (2-3 Tropfen) verdünntem Serum gemischt und eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert.

Die Tab. 10 zeigt an, welche Seren dabei Verwendung fanden.

Tab. 10: Seren, die in der Immunfluoreszenz getestet wurden

1. Kochsalz (als Kontrolle)
 2. Serum von Normalpersonen
 3. Autologes Serum
 4. Serum von Patienten mit gleichem Tumor
 5. Serum von Patienten mit anderem Tumor
-

Nach einer halben Stunde war die eventuell ablaufende Antigenantikörper Reaktion praktisch zu 100 % beendet. Durch zweimaliges Waschen wurden alle nicht an die Zellen gebundenen Serumbestandteile und Antikörper abgetrennt, während die Antikörper, die mit einem Tumorantigen der Zellmembran reagiert hatten, durch den Waschvorgang nicht von den Zellen gelöst werden konnten. Diese Antikörper wurden nun mittels FITC-markierter Antikörper sichtbar gemacht.

3. Inkubation mit verschiedenen FITC-konjugierten Antihuman-Seren

In einer zweiten immunologischen Reaktion wurden die zellständigen Antikörper durch 1:10 verdünnte Antihuman-Seren, Fluoreszein-IsoThio-Cyanat (FITC)-konjugiert, angefärbt. Welche wir in unseren Testen verwendeten, führt die Tab. 11 auf.

Tab. 11: FITC-konjugierte Antiseren gegen Humanglobuline

1. Antihuman-IgG/ γ -Ketten spezifisch vom Kaninchen,
molarer F/P-Quo.: 2,2
2. Antihuman-IgM/ μ -Ketten-spezifisch vom Kaninchen,
molarer F/P-Quo.: 2,5

3. Antihuman-IgA/ α -Ketten-spezifisch vom Kaninchen,
molarer F/P-Quo.: 2,3
4. Antihuman-F(ab)₂-Fragment von IgG von der Ziege
1-3: Behringwerke, Frankfurt, 4: Nordic-Immunological-
Laboratories, Tilburg, Niederlande Vertrieb Byk-Mallinck-
rodt, Dietzenbach.

Lyophilisierte Trockensubstanz in 1 ml Aquadest lösen,
weitere Verdünnung mit Kochsalzlösung 1:10 erst vor Ge-
brauch.

Diese Antiseren wurden im Überfluß zugegeben: 50-100 μ l
(2-3 Tropfen). Die Reagenzbedingungen entsprechen denen der
ersten Antigen-Antikörper-Reaktion, nämlich 30 min Inku-
bationszeit bei Zimmertemperatur. Der ungebundene Teil des
Konjugats wurde durch dreimaliges Waschen beseitigt.
Tab. 12 zeigt, welches Aussehen letztendlich unser Testan-
satz hatte.

Tab. 12: Testansatz bei der Indirekten Immunfluoreszenz

Blasentumorzellen +

	1.	2.	3.	4.	5.
	Koch	Serum v.	Autologes	Serum v.	Patienten mit
	salz	Nor.per.	Serum	gleichem /	anderen Tumor
1. Anti-Hu-IgG	...	...	...	...	...
2. Anti-Hu-IgM	...	...	...	...	...
3. Anti-Hu-F(ab) ₂	...	...	...	...	...

Um die Spezifität der immunologischen Reaktion festzustellen, wurden also verschiedene Gewebe (Blasen- und Nierentumor, Normale Blase und Niere), verschiedene Seren und verschiedene FITC-konjugierte Antihumanseren verglichen.

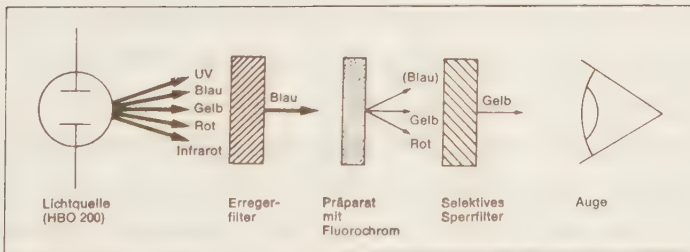
Um festzustellen, wieviel Prozent der Zellen nach der ganzen Testprozedur noch vital waren, wurden stichprobenartig Färbungen mit Trypanblau¹ durchgeführt, wobei sich Prozentsätze von vitalen Zellen um 85 % ergaben.

¹ = Trypanblau-Standard, Fluka AG, Buchs SG, Schweiz, Pulver mit Aquadest zweiprozentig verdünnen, vor Gebrauch dann nochmals mit Kochsalz 1:1 verdünnen und scharf abzentrifugieren (1200 U/min, 5 min).

4. Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop¹. Ein Tropfen der Zellsuspension, die mit Serum und FITC-markierten Antihumen-Seren inkubiert war, wird auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt.

Abb. 1:



Schematischer Aufbau eines Fluoreszenz-Mikroskops (ohne Optik) für Blau-Anregung (z. B. FITC-Methode)

Dem Fluoreszenz-Mikroskop liegt folgende, in Abb. 1 gezeigte Anordnung zugrunde.

¹ = Fa. Zeiss, Oberkochen

Als Beleuchtungsquelle dient eine Quecksilberlampe, von der kurzwelliges Erregerlicht ausgeht. Aus diesem Erregerlicht werden durch Absorptionsfilter (Rotfilter 38 Bg und Kurzpaßfilter Kp 500) die gewünschten Wellenlängen (440-500 nm) herausgefiltert. Durch einen Kondensor gebündelt trifft nun dieses Erregerlicht auf den Objektträger mit der Zellsuspension. Die Frontlinse des Kondensors und die Unterseite des Objektträgers werden, um eine bessere Ausleuchtung des Präparates zu bekommen, durch einen Tropfen Immersionsöl (Brechungsindex 1,516) miteinander verbunden.

Trifft nun das Erregerlicht auf fluoreszenzfähige Moleküle, so werden diese angeregt, und sie geben einen Teil der aufgenommenen Energie als Fluoreszenzlicht mit einem optimalen Emissionsbereich von 520-530 nm wieder ab. In einem weiteren Filter (Sperrfilter) wird nun das ankommende Erregerlicht absorbiert, und nur das Fluoreszenzlicht trifft durch den Sperrfilter hindurch und gelangt zur Beobachtung. Als Objektiv wurden ein Neofluar 40, 0,75/160/0/17 bzw. ein Panneofluar 25, 0,8 -Öl verwendet. Abgelesen wurde mit einer 40fachen Vergrößerung.

In dieser Dunkelfeldanregung wird im Mikroskop ein schwarzer Hintergrund sichtbar, vor dem sich die Zellen hellrot abheben. Die Fluoreszenz leuchtet punktförmig apfelgrün auf und als positiv werden Zellen mit mindestens drei Fluoreszenzpunkten bewertet. Der Prozentsatz positiver Zellen wird durch Auszählen von 200 Zellen bestimmt. Um Fehler durch subjektive Ablesung zu

vermeiden, wurde stichprobenartig die Ablesung von einer zweiten Person wiederholt, was meist ein sehr hohes Maß an Übereinstimmung zeigte.

Dieser Prozentsatz positiver Zellen kann als halbquantitatives Maß für die Antikörpermenge im Patientenserum gewertet werden. Wir bewerteten die Ergebnisse folgendermaßen:

0 - 10 %	positive Zellen:	negativ
10 - 20 %	positive Zellen:	schwach positiv
mehr als 20 %	positive Zellen:	positiv

Der Vergleich der verschiedenen Testgruppen (Tab. 10, S. 47) wurde mit einer Einfachen Varianzanalyse, an die ein Tukey-Test angeschlossen wurde, durchgeführt.

5. Immunfluoreszenz mit Blasenspülungen

Wir führten die Indirekte Immunfluoreszenz nicht nur mit Tumorgewebe bzw. normalen Vergleichsproben durch, sondern auch mit Zellen, die wir aus dem Abzentrifugieren von Blasenspülungen erhielten.

Während wir in ersterem Versuch mit Hilfe eines bekannten Antigens (Tumorgewebe bzw. normales Gewebe) Antikörper in verschiedenen Seren nachzuweisen versuchten, wollten wir in diesem Test mit Hilfe von verschiedenen Seren Tumorzellen in den Blasenspülungen identifizieren.

Untersucht wurden Blasenspülungen von

-Tumorpatienten

-Patienten mit Zystitis oder anderen urologischen Erkrankungen

-Tumorpatienten, die gerade rezidivfrei waren.

Der ganze Test war als Blindstudie angelegt, d.h. uns wurde von der Klinik nicht mitgeteilt, um welchen Patienten es sich jeweils handelte.

Ausgezählt wurden alle Zellen, also auch normale Urothelien, um gerade die fließenden Übergänge zu entarteten Zellen zu erfassen.

Von allen Patienten wurde außerdem ein Teil der Blasenspülflüssigkeit zur zytologischen Untersuchung nach Papanikolaou abgegeben. Diese Untersuchung wurde in der Urologischen Klinik durchgeführt. Bei den meisten Patienten wurde auch eine histologische Untersuchung im Pathologischen Institut vorgenommen, die Diagnose Zystitis wurde klinisch und zystoskopisch gestellt.

4.2. GEWINNUNG VON LYMPHOZYTEN (14)

Heparinisiertes Vollblut (0,1 ml Heparin auf 10 ml Blut) wird in einem Plastik-Zentrifugenröhrchen über einen Ficoll-Iso-paque-Gradienten¹ mit der spez. Dichte 1,077 im Verhältnis Ficoll:Blut = 1:2 geschichtet. Nach einer Zentrifugation von 2800 U/min, 20 min lang, bleiben die meisten mononukleären Zellen auf Grund ihrer spez. Dichte als ein Ring über dem Ficollgradienten und unterhalb des Plasmas liegen.

Erythrozyten und Granulozyten senken sich durch den Ring ab. Differentialfärbungen von Ausstrichen der Zellen aus dem Interphasenring zeigen ca. 90 % Lymphozyten und ca. 10 % monocytaire Zellen.

Dieser Interphasenring wird mit einer Pasteurpipette abgehoben und in einem anderen Plastikröhrchen mit Phospat-gepufferter-Kochsalzlösung, pH 7,2, suspendiert, und 10 min bei 15-1700 U/min zentrifugiert.

Der Überstand wird vorsichtig abgegossen. Die Zellen, die am Boden als Pellet verbleiben, werden noch zweimal in gleicher

¹ = Ficoll-Isopaque-Lösung, D = 1,077,

75 % Isopaque 20 ml + 9,556 g Ficoll + 130,4 ml Aquadest
Apotheke der Klinischen Universitätsanstalten München

Weise gewaschen.

Abschließend werden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer nach dem üblichen Leukozyten-Zählverfahren gezählt und mit NaCl auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Falls die Lymphozyten nicht nur zur T-B-Zell-Differenzierung verwendet werden sollen, sondern auch für den im nächsten Kapitel beschriebenen Suppressor-Zell-Test, erfolgt die Gewinnung der Lymphozyten unter streng sterilen Kautelen unter einem LaminAir-Flow¹. Der Interphasenring wird dann nicht in NaCl, sondern in sterilem Waschmedium suspendiert und ebenfalls in Waschmedium dreimal gewaschen. Unser Waschmedium besteht aus 1 ml Antibiotikum/Antimykotikum² + 1,3 ml Bicarbonat³ ad 100 ml RPMI-Medium⁴. Nach dem Zählen werden die

¹ = LaminAir-Flow, Fa. CEAG Schirp Reinraumtechnik GmbH, Selm-Bork (Westfalen)

² = Penicillin 10000 U/ml, Streptomycin 10000 mcg/ml, Fungizone 25 mcg/ml CIBCO-Laboratories, Grand-Island, USA; dt. Niederlassung: Karlsruhe

³ = 8,4 % Bicarbonat, Fresenius, Bad Homburg

⁴ = RPMI-1640-Medium-Instamed^R mit L-Glutamin, Fa. Seromed, München
Trockensubstanz in 1 l Aquadest lösen, Zugabe von 26,7 ml 7,5 % NaHCO₃ und falls nötig mit 1-n-Salzsäure auf pH 7,0-7,5 einstellen, steril filtrieren durch ein Seitz-Filter mit 1-1,5 atü

Lymphozyten mit Kulturmedium, bestehend aus 90 ml Waschmedium + 10 ml Fetales Kälberserum¹, auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

4.3. BESTIMMUNG DER B-LYMPHOZYTEN MIT =====

DIREKTER IMMUNFLUORESCENZ =====

Für die Bestimmung der B-Lymphozytenzahl macht man sich die Tatsache zunutze, daß B-Lymphozyten Antikörper produzieren (IgG/IgM/IgA etc.), die auf deren Zelloberfläche nachweisbar sind. Mittels FITC-konjugierter anti-human-IgGesamt-Antikörper stellt man sie in Direkter Immunfluoreszenz dar.

0,1 ml mit 10^5 Zellen wird mit 50-100 μ l (1-2 Tropfen) 1:10 verdünntem FITC-markiertem Antihuman-IgGesamt² versetzt und eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. In dieser Zeit

¹ = Fetales Kälberserum: Rehatuin F.S., steril filtriert, Reheis Chemical Company, Division of Armow Pharmaceutical Company, Arizona, USA; dt. Vertrieb Fa. medac, Hamburg

² = Antihuman-Ig(IgG+IgM+IgA)/ H+L-Kette von der Ziege, Behring-Werke, Frankfurt, Lyophilisierte Trockensubstanz in 1 ml Aquadest lösen, weitere Verdünnung 1:10 mit Kochsalzlösung.

reagieren die B-Zell-ständigen Antikörper mit den zugesetzten Antihuman-Antikörpern. Auch Subpopulationen der B-Lymphozyten können dargestellt werden, indem man anstelle von Antihuman-IgGesamt Antihuman-IgG, -IgM, -IgA verwendet.

Durch dreimaliges Waschen werden die nicht zellgebundenen Antikörper abgewaschen. Im Fluoreszenzmikroskop wird dann, in gleicher Weise wie oben bei der Indirekten Immunfluoreszenz geschildert, der Prozentsatz fluoreszierender Lymphozyten durch Auszählen von 200 Zellen ermittelt.

Dieser entspricht dann der B-Zell-Population.

4.4. BESTIMMUNG DER T-LYMPHOZYTEN MIT DER =====

ROSETTENMETHODE

=====

Humane T-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche einen spezifischen Rezeptor für Schaf-Erythrozyten. Über diesen Rezeptor werden die Schaf-Erythrozyten ringförmig an die Zelle gekoppelt, so daß das Bild einer "Rosette" entsteht (83,97,156).

Dazu werden Lymphozyten im Verhältnis 1:10 mit Schaf-Erythrozyten (90 ml Schaf-Vollblut + 10 ml Na-EDTA) gemischt, die vorher dreimal mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung gewaschen wurden: 1×10^5 Lymphozyten + 1×10^6 Schaf-Erythrozyten. Diese Mischung wird eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (1200 U/min, 5 min) bleibt das Reagenzröhrchen mindestens 4 Stunden, am besten aber über Nacht, im Kühlschrank bei 4°C stehen

Vor dem Ablesen wird der Bodensatz vorsichtig resuspendiert und ein Tropfen davon auf ein Deckglas gegeben. Dieses wird wiederum behutsam auf einen Objektträger, mit dem Tropfen nach unten, aufgelegt. Anschließend wird der Prozentsatz ringbildender Lymphozyten ("Rosetten") unter dem Lichtmikroskop bei 400facher Vergrößerung ermittelt. Lymphozyten mit drei und mehr Schaf-Erythrozyten werden als Rosetten gewertet. Der Prozentsatz dieser Zellen entspricht dem T-Zell-Anteil.

4.5. BESTIMMUNG DER GESAMTLYMPHOZYTEN

Die Werte für die Gesamtlymphozyten wurden von der Klinik übernommen. Sie wurden berechnet aus der Leukozytenzahl/ μ l (Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer) und dem prozentualen Lymphozytenanteil im Differentialblutbild (Methode nach Pappenheim). Die Ergebnisse wurden mit einem einfachen Mittelwertsvergleich auf Signifikanz getestet.

4.6. SUPPRESSOR-ZELL-TEST =====

Unser Testsystem basiert auf dem Verfahren von Shou, Schwartz und Good (128) und der Modifikation dieses Tests durch Hammer, Jerry und Lewis (63) V.a. die Berechnung der Suppressor-Zell-Aktivität erfolgte nach dieser Modifikation, abweichend vom Test nach Shou und Mitarbeiter.

4.6.1. Generation von Suppressorzellen

Über Ficoll separierte Lymphozyten (s. Kap. "Gewinnung von Lymphozyten") werden nach dreimaligem Waschen mit Waschmedium¹ gezählt und mit Kulturmedium¹ auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Auch alle weiteren Arbeitsgänge erfolgen unter sterilen Bedingungen unter dem LaminAir-Flow.

¹ = Wasch- und Kulturmedium, s.S.32, Kap. "Gewinnung von Lymphozyten"

Die eine Hälfte der Lymphozyten wird mit dem T-Zell-Mitogen Concanavalin A¹ (=ConA) versetzt, pro 1 ml mit 10^6 Zellen 0,05 ml Con A, unter der Vorstellung, daß durch dieses Mitogen präexistent vorhandene T-Suppressorzellen aktiviert werden. Der anderen Hälfte der Lymphozyten wird kein Mitogen zugesetzt, so daß sich nur die spontanen Suppressorzellen bilden. Diese beiden Gruppen werden von uns im folgenden als spontane (=SSZ) bzw. aktivierte (=ASZ) Suppressorzellen bezeichnet. Ihre Fähigkeit, die Proliferation anderer Lymphozyten zu unterdrücken, gilt als Suppressor-Zell-Aktivität.

Beide Gruppen werden über 48 Stunden im Brutschrank² bei 37°C, 5 % CO₂ und gesättigtem Wasserdampf inkubiert. Eigene Vorversuche haben ergeben, daß nach dieser Zeit von 48-72 h die Suppressor-Zell-Aktivität (=SZA) optimal aktiviert ist.

¹ = Concanavalin A, Fa. Wellcome-Research-Laboratories,
Beckenham-England

Trockensubstanz in 5 ml Aquadest lösen, weitere Verdünnung mit
Waschmedium 1:5.

² = Brutschrank Fa. Heräus-Christ GmbH, Osterode am Harz

4.6.2. Ansatz der Testkulturen

Nach dieser Generation von Suppressorzellen soll nun untersucht werden, inwieweit diese imstande sind, die Proliferationsfähigkeit anderer, durch Mitogene oder Alloantigen stimulierter Lymphozyten (=Targetzellen) zu unterdrücken. Zu diesem Zweck werden sie zunächst dreimal gewaschen und damit von freiem ConA gereinigt, gezählt und mit Kulturmedium wieder auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Um zu verhindern, daß man die Proliferation der Suppressorzellen (SSZ, ASZ) mißt, werden sie vor der Zugabe zum Testsystem mit 2000 rad in einem Caesium-Gamma-Strahler bestrahlt (x = bestrahlte Zellen im folgenden), so daß man nur die Proliferation der Targetzellen mißt. Durch die Bestrahlung geht zwar die Proliferationsfähigkeit der Suppressorzellen verloren, jedoch nicht deren Fähigkeit, andere Lymphozyten in ihrer Aktivität zu supprimieren oder zu stimulieren (27).

Nach dieser Bestrahlung werden nun verschiedene Testansätze durchgeführt:

Zum einen werden die Suppressorzellen mit frisch präparierten Lymphozyten gesunder Personen gemischt (=Targetzellen, im folgenden mit Lymphozyten A bezeichnet) und eines der folgenden Mitogene als Proliferationsanreiz zugesetzt: ConA, Pokeweed Mitogen¹

¹ = Pokeweed-Mitogen, Paesel GmbH, Frankfurt; Trockensubstanz in 5 ml

Aquadest lösen, weitere Verdünnung mit Waschmedium 1:10.

(=PMW) und Phytohämagglutinin¹ (=PHA).

Zum anderen werden die Suppressorzellen einer Gemischten-Lymphozyten-Kultur (=MLC) beigefügt, bestehend aus Lymphozyten A als Targetzellen und Lymphozyten B einer zweiten gesunden Person, die als stimulierende Alloantigene für die Targetzellen dienen und ebenfalls wie die Suppressorzellen bestrahlt worden sind. Als Kontrolle wird ein Testansatz ohne Suppressorzellen bezeichnet, dem, um eine gleiche Zellzahl wie bei den Ansätzen mit Suppressorzellen zu bekommen, noch Lymphozyten A beigefügt werden. Sie werden ebenso wie die Suppressorzellen bestrahlt, sind aber nicht 48 h inkubiert worden und stammen vom gleichen Individuum wie die Targetzellen.

Wir haben also folgende Testansätze im Suppressor-Zell-Test:

¹ = Phytohämagglutinin, Wellcome-Research-Laboratories, Beckenham-England; hochgereinigte Proteinfraction von Phaseolus vulgaris-Samenextrakt, 2 mg Trockensubstanz in 10 ml Aquadest lösen, weitere Verdünnung mit Waschmedium 1:5.

Tab. 13: Testansätze im Suppressor-Zell-Test

1. Mitogenansätze: a) Ly. A + PHA + SSZ
b) Ly. A + PWM jeweils + ASZ
c) Ly. A + ConA + Ly. A_x (Kontrollgr.)

2. Gemischte Lymphozyten-Kultur (MLC):

- Ly. A + Ly. B_x + SSZ
+ ASZ
+ Ly. A_x (Kontrollgruppe)

Abkürzungen: Ly. A = Targetzellen

ASZ = aktivierte Suppressorzellen (mit ConA
inkubiert)

SSZ = spontane Suppressorzellen (ohne ConA in-
kubiert)

Ly. B = stimulierendes Alloantigen

x = bestrahlt mit 2000 rad

Die Testansätze erfolgten in Nunclon-Mikrotiterplatten¹ in Drei-
fachbestimmung. Von den Lymphozyten A und B, sowie von den

¹ = Fa. Nunc-Intermed GmbH, dt. Vertrieb Wiesbaden

Suppressorzellen werden jeweils 10^5 Zellen (=0,1 ml) eingesetzt.
Einen Überblick über die Verteilung in die Mikrotiterplatten
gibt Tab. 14 und 15.

Tab. 14: Schema der Mitogenansätze im Suppressor-Zell-Test

Reihen-Nr. der

Mikrotiterplatte	PHA	/	PWM	/	ConA
1	Ly. A	+	SSZ		
2	Ly. A	+	ASZ		
3	Ly. A	+	Ly. A _x		

Tab. 15: Schema der Gemischten-Lymphozyten-Kultur im Suppressor-Zell-Test

Reihen-Nr. der

Mikrotiterplatte	+ SSZ	/	+ ASZ	/	+ Ly. A _x
1	Ly. A		+	Ly. B _x	

Beide Testansätze werden nun im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und gesättigtem Wasserdampf inkubiert. Die Inkubationszeit für die Mitogenansätze beträgt 3 Tage, die für die Gemischte-Lymphozyten-Kultur 5 Tage.

Nach Ablauf dieser Inkubationszeiten wird jedem Plattenloch 0,02 ml ³H-Thymidin ¹ zugegeben, das proportional zur Proliferation der Targetzellen in deren DNS eingebaut wird. Für diesen Einbau werden die Testansätze nochmals 16 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen durch Einfrieren der Platten lysiert. In eingefrorenem Zustand können die Platten auch längere Zeit (Monate) bis zur Auswertung aufbewahrt werden.

4.6.3. Auswertung

Die Auswertung geht folgendermaßen vor sich: Die eingefrorenen Platten werden aufgetaut. In einer Mash-Erntemaschine² werden die

¹ = Methyl-³H-Thymidin, Radiochemical Centre, Amersham- England.

Spez. Aktivität: 5 Ci/mmol (21 mCi/mg), Molekulargewicht 242,
Radioaktive Konzentration: 1 mCi/ml wässrige Lösung.

Steril filtriert, vor Gebrauch Verdünnung mit Kochsalz 1:20

² = Fa. Flow-Laboratories, Bonn (dt. Vertrieb)

Zellkerne der lysierten Lymphozyten absorbiert an Glasfaserfilter¹. Das ungebundene ³H-Thymidin wird abgespült und aus den Glasfaserstreifen werden Plättchen ausgestanzt, die das Adsorbat eines Plattenlochs enthalten. Diese Plättchen werden in Plastikröhrchen gegeben, mit einer Szintillationsflüssigkeit² versetzt und im Beta-Counter³ die eingebaute Radioaktivität in counts per minute (cpm) gezählt.

¹ = Reeve angel^R, Fa. Whatman inc., Clifton-New Jersey, USA

² = Szintillationsflüssigkeit: 20 g 2,5-Diphenyloxazole (PPO)

0,2 g p-bis- 2-(5-phenyloxazolyl)-
Benzene
in 5 l Toluol

New England, Albany St., Boston-USA

³ = Packard-Tri-Carb-Liquid-Szintillation-Spectrometer,

Fa. Packard, Frankfurt (dt. Vertrieb)

4.6.4. Berechnung der Suppressor-Zell-Aktivität:

Da von jedem Ansatz Dreifachbestimmungen durchgeführt worden sind, wird zunächst der Mittelwert daraus berechnet. Die Suppressor-Zell-Aktivität wird nach folgenden Formeln berechnet:

a) Mitogenansätze (PHA, PWM, ConA):

$$100 \times \left(1 - \frac{\text{cpm von } 10^5 \text{ SSZ}_x \text{ (oder ASZ}_x) + 10^5 \text{ Ly. A}}{\text{cpm von } 10^5 \text{ Ly. A}_x + 10^5 \text{ Ly. A}} \right)$$

b) Gemischte-Lymphozyten-Kultur (MLC):

$$100 \times \left(1 - \frac{\text{cpm von Ly. A} + \text{Ly. B}_x + \text{SSZ}_x \text{ (oder ASZ}_x)}{\text{cpm von Ly. A} + \text{Ly. B}_x + \text{Ly. A}_x} \right)$$

Abkürzungen: Ly. A = Targetzellen

Ly. B = Alloantigen in der MLC

Ly. A_x = Kontrollgruppe

SSZ = spontane Suppressorzellen

ASZ = aktivierte Suppressorzellen

Im Gegensatz zu anderen Autoren (46,124,128) setzen wir vor die Formel noch ein Minuszeichen, um eine Suppression mit einem Minuszeichen und eine Stimulation mit einem Pluszeichen auszudrücken. Die Suppressor-Zell-Aktivität gibt also das prozentuale Verhältnis der Stoffwechselaktivität der Targetzellen, die durch Suppressorzellen beeinflusst wurden, zu der Stoffwechselaktivität der Targetzellen, die nur mit Kontrolllymphozyten gemischt wurden, an. Im Gegensatz zu unserer Berechnung bezeichnen Shou und andere Autoren (128) das Ergebnis der ASZ im Verhältnis zum Ergebnis der SSZ als Suppressor-Zell-Aktivität.

4.6.5. Statistischer Vergleich

Mit Hilfe einer Einfachen Varianzanalyse, an die noch der Tukey-Test angeschlossen wurde, wurden die verschiedenen Patientengruppen miteinander verglichen und auf Signifikanz geprüft.

5. R E S U L T A T E

INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ MIT

TUMOR- UND VERGLEICHSGEWEBE

Blasen und Nierenkarzinomzellen wurden mittels Indirekter Immunfluoreszenz auf ihre Antigen-Eigenschaften untersucht. Sie wurden nach ihrer Stadiumszugehörigkeit in Gruppen eingeteilt (s. Kap. 2 "Patientengut", Blasen- bzw. Nierenkarzinompatienten). Normales Urothel und normale Niere (Herkunft s. Kap. 2.4. "Material von Patienten") wurden mit dem Karzinomgewebe verglichen.

Die Seren, die bezüglich ihrer Antikörper gegen Tumor bzw. Normalgewebe untersucht wurden, sind im Kap. "Methodik, Indirekte Immunfluoreszenz" (4.1.), Tab. 10, aufgeführt, ebenso die FITC-konjugierten Antiseren gegen Humanplasmaproteine, die zur Markierung der Antikörper dienten (Tab. 11). Ebenso diesem Kapitel ist der Maßstab für die Bewertung der Ergebnisse (negativ-positiv) zu entnehmen (S.53).

In den folgenden Tabellen 15-20 sind die Ergebnisse der verschiedenen Gruppen in Mittelwerten und Standardabweichungen zusammengefaßt.

5.1.1. Blasen-Ca-Zellen, Nachweis von Antitumor-Antikörpern der Klasse IgG in den Seren (Tab. 15)

Das normale Urothel zeigt keine Fluoreszenz. Auch die Kochsalzkontrolle blieb negativ bei allen drei Gruppen von Blasen-Ca-Zellen (nur 1-3 % positive Zellen).

Bei Zugabe von Serum normaler Personen zu Blasen-Ca-Zellen aller drei Gruppen fand sich ein Anteil von 8-9 % positiven Zellen. Ein signifikanter Anstieg ($p < 0,01$) ist beim autologen Serum der Blasen-Ca-Patienten (24-30 %) im Vergleich zum Serum normaler Personen festzustellen.

Diese Antikörper waren schon bei der Gruppe I (24 %) nachweisbar, also bei den Tumoren, die die Basalmembran noch nicht durchbrochen haben.

Papillome und Ca in situ (also G0 und G1) zeigten hierbei gleiche Werte, so daß sie in der Gruppe I zusammengefaßt wurden. Der Wert von Gruppe II, 25 %, ist nahezu identisch mit dem der Gruppe I, während sich bei Patientenzellen und -seren des Stadiums III der höchste Wert mit 30 % findet. Patienten aller Tumorstadien besitzen also IgG-Antikörper gegen ihren Tumor, wobei in leichter Anstieg proportional zum Tumorstadium festzustellen ist.

Seren von anderen Blasen-Ca-Patienten (allogene Seren) zeigten ebenfalls eine positive Fluoreszenz, die dem Ergebnis der autologen Seren entspricht und sich signifikant ($p < 0,01$) von den Seren gesunder Vergleichspersonen unterscheidet: Zellen von

Gruppe I reagierten mit allogenen Seren aller drei Blasen-Ca-Stadieneinteilungen etwa gleich stark (22-27 %) wie mit dem autologen Serum. Nicht anders verhielt es sich mit den Zellen der Gruppen II und III.

Seren von Nieren-Ca-Patienten zeigten kaum mehr Antikörper gegen Blasen-Ca-Zellen als Seren gesunder Personen. Der Prozentsatz von 10-12 % positiven Zellen liegt nur leicht darüber und unterscheidet sich signifikant ($p < 0,01$) vom autologen Serum und den allogenen Blasen-Ca-seren.

INDIREKTE IMMUNFLUORESZENZ MIT BLASEN-CA-ZELLEN

FITC-markiertes Antiserum: Anthuman-IgG

Zellen:	Seren:	Kochsalz	Normalperson	Autolog	Allogene Blasen-Ca-Patienten			Nieren-Ca-Patienten
					I: Tis No Mo	II: T1-3 No-3 Mo	III: T4 / M1	
Norm. Urothel	III	0 $\pm$ 0	I 1 $\pm$ 1	III 1 $\pm$ 1	II 0 $\pm$ 0	II 0 $\pm$ 0	III 1 $\pm$ 1	-
I Tis No Mo	XIII	1 $\pm$ 1	VIII 8 $\pm$ 4	XIII 24 $\pm$ 12	XV 22 $\pm$ 10	III 23 $\pm$ 6	XII 27 $\pm$ 12	V 10 $\pm$ 4
II T1-3 No-3 Mo	XV	3 $\pm$ 3	IX 8 $\pm$ 4	XIV 25 $\pm$ 11	XIII 28 $\pm$ 17	XI 24 $\pm$ 6	VII 30 $\pm$ 9	VII 11 $\pm$ 5
III T4 oder M1	IX	2 $\pm$ 3	VI 9 $\pm$ 6	IX 30 $\pm$ 9	X 30 $\pm$ 10	II 37 $\pm$ 12	IV 56 $\pm$ 10	VI 12 $\pm$ 5

Tab. 15: Indirekte Immunfluoreszenz mit Blasen-Ca-Zellen, FITC-markiertes Antiserum: Anthuman-IgG, römische Ziffern = n-Zahl. Angaben in Prozent positiver Zellen $\pm$ Standardabweichungen. Vertikal sind die im Test verwendeten Zellen nach ihrer Stadieneinteilung, horizontal die dazugegebenen Seren aufgetragen.

1.2. Nieren-Ca-Zellen, Nachweis von Antitumor-Antikörpern der Klasse IgG in den Seren (Tab. 16)

Gewebe aus dem normalen Teil der Niere zeigte, entsprechend dem normalen Urothel, keine Fluoreszenz, die für Antikörper gegen normales Nierengewebe sprechen würde. Im autologen Serum, sowie in den allogenen Seren anderer Nieren-Ca-Patienten und gesunder Personen beträgt der Prozentsatz 1-2 %, bei Seren von Blasen-Ca-Patienten 5 % (alles negativ).

Die Kochsalzkontrolle war bei den meisten Nieren-Ca-Zellen der Gruppe I und allen der Gruppe II negativ (2 %) wie bei den Blasen-Ca-Zellen (Tab. 15). Bei 4 Patienten der Gruppe I fand sich allerdings schon im Leerwert der Kochsalzkontrolle ein hoher Prozentsatz positiver Zellen von durchschnittlich 29 %, weshalb sie in der Tabelle in einer extra Zeile zusammengefaßt wurden.

INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ MIT NIEREN-CA-ZELLEN
FITC-markiertes Antiserum: Antihuman-IgG

Seren: Zellen:	Kochsalz	Normalperson	Autolog	Allogene Nieren-Ca-Patienten		Blasen-Ca-Patienten
				I: T1-3 No Mo	II: T3-4 NI-3/M1	
Normale Niere	XVIII 0 ± 0	XIV 2 ± 3	XIV 1 ± 2	XVIII 2 ± 4	XVII 2 ± 2	VIII 5 ± 4
I T1-3 No Mo	Niedrige Kontrolle ^x 2 ± 3	IX 10 ± 7	IX 26 ± 14	IX 26 ± 18	V 34 ± 13	V 8 ± 8
	Hohe Kontrolle ^x 29 ± 8	III 41 ± 11	IV 60 ± 8	V 54 ± 13	III 54 ± 13	II 37 ± 11
II T3-4 NI-3/M1	VI 2 ± 3	III 9 ± 7	III 39 ± 15	IV 25 ± 9	VII 26 ± 9	III 13 ± 10

Tab. 16: Indirekte Immunfluoreszenz mit Nieren-Ca-Zellen, FITC-markiertes Antiserum: Antihuman-IgG, römische Ziffern = n-Zahl. Angaben in Prozent positiver Zellen ± Standardabweichungen. Vertikal sind die im Test verwendeten Zellen nach ihrer Stadieneinteilung, horizontal die dazugegebenen Seren aufgetragen.

^x siehe Text Seite 73 und 75

Wenn wir diese Gruppe zunächst einmal außer acht lassen, so ergibt sich beim Nieren-Ca das gleiche Bild, wie es schon das Blasen-Ca bot (Tab. 15):

Zugabe von Seren gesunder Personen ergab 9-10 % positive Zellen (Blasen-Ca: 8-9 %), die autologen Seren zeigten in der Gruppe I 26 % und in der Gruppe II einen Anstieg auf 39 %. Beide Gruppen unterscheiden sich signifikant von den Seren gesunder Vergleichspersonen ($p < 0,01$).

Die Seren von allogenen Nieren-Ca-Patienten reagierten ebenso in der gleichen Höhe positiv (25-34 %) und im Vergleich zu Normalpersonen signifikant wie das autologe Serum, während sich bei Zugabe von Serum von Blasen-Ca-Patienten wiederum der gleiche Prozentsatz (8-13 %) wie bei den gesunden Personen fand (signifikanter Unterschied zum autologen und zu allen allogenen Nieren-Ca-Seren $P < 0,05$).

Sowohl beim Blasen-Karzinom als auch beim Nieren-Karzinom liegt die Fluoreszenz im Serum gesunder Personen und in den Seren von Patienten der anderen Tumorart in der gleichen Größenordnung von 8-13 %. Deutlich höher lagen die Werte des autologen Serums und der Seren von Patienten mit histologisch gleichem Tumor in beiden Tumorarten.

Zieht man bei den 4 Patienten der Gruppe I, deren Kochsalzkontrolle schon bei durchschnittlich 29 % lag, diesen Leerwert von allen Seren ab, kommt man zu folgenden Ergebnissen: Normalpersonen 12 %, autologes Serum 31 %, allogene Nieren-Ca-Patienten Gruppe I 25 % und Gruppe II 25 %, Serum von Blasen-Ca-Patienten 8 %. Diese Werte entsprechen ziemlich genau dem Ergebnis, das auch bei den anderen Patienten dieser Gruppe gefunden wurde.

5.1.3. Blasen-Ca-Zellen, Nachweis von Antitumor-Antikörpern der Klasse IgM in den Seren (Tab. 17)

Es soll untersucht werden, ob auch Antikörper der Klasse IgM gegen Karzinomzellen im Patientenserum vorhanden sind. Zu deren Nachweis wurde μ -Ketten- spezifisches FITC-konjugiertes Anti-human-IgM eingesetzt.

Normales Urothel als Vergleichsgruppe zu den Karzinomzellen konnte leider nicht getestet werden, da davon nur so wenig zur Verfügung stand, daß es nur für den Versuch des IgG-Nachweises ausreichte.

Die Kochsalzkontrolle war in allen Stadien negativ. Das autologe Patientenserum zeigte mit 3-5 % positiven Zellen nur einen sehr geringen Anstieg verglichen mit dem Serum gesunder Personen und konnte nicht als positiv gewertet werden. Die Seren allogener Blasen-Ca-Patienten bewegten sich ebenfalls in diesem Bereich und die Resultate der Seren von Patienten einer anderen Tumorart (Nieren-Ca) glichen wieder denen gesunder Vergleichspersonen. Unterschiede zwischen den verschiedenen Stadien-Gruppeneinteilungen waren nicht festzustellen.

IgM-Antikörper gegen Blasen-Karzinomgewebe konnten also nicht nachgewiesen werden.

INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ MIT BLASEN-CA-ZELLEN
FITC-markiertes Antiserum: Antihuman-IgM

Zellen:	Seren:	Kochsalz	Normalperson	Autolog	Allogene Blasen-Ca-Seren			Nieren-Ca-Patienten
					I: Tis No Mo	II: T1-3 No-3 Mo	III: T4/M1	
I		XII	IV	XII	XVII	II	VIII	V
Tis No Mo		0 ± 0	1 ± 1	3 ± 4	5 ± 5	6 ± 2	3 ± 4	1 ± 1
II		XI	X	X	VII	XIII	IV	IX
T1-3 No-3 Mo		0 ± 1	2 ± 1	5 ± 3	4 ± 4	5 ± 4	6 ± 3	2 ± 2
III		VI	IV	VI	V	IV	I	VI
T4 oder M1		0 ± 0	1 ± 1	4 ± 4	1 ± 2	1 ± 2	2 ± 0	1 ± 1

Tab. 17 Indirekte Immunfluoreszenz mit Blasen-Ca-Zellen, FITC-markiertes Antiserum: Antihuman-IgM, römische Ziffern - n-Zahl, Angaben in Prozent positiver Zellen ± Standardabweichungen. Vertikal sind die im Test verwendeten Zellen nach ihrer Stadieneinteilung, horizontal die dazugegebenen Seren aufgetragen.

1.4. Nieren-Ca-Zellen, Nachweis von Antitumor-Antikörpern der Klasse IgM in den Seren (Tab. 18)

Normale Niere stand als Vergleichsgewebe zur Verfügung, sie zeigte keine Fluoreszenz.

Das autologe Serum (6 und 2 %) und die Seren anderer Patienten mit Nieren-Ca (2-3 %) unterschieden sich nur geringfügig vom Serum normaler Personen (0-1 %) und gar nicht vom Serum von Patienten mit einem anderen Tumor (2-3 %). Nur der Wert des

autologen Serums bei den Zellen der Gruppe I liegt mit 6 % etwas über den übrigen Werten. Auch beim Nierenkarzinom fand sich, ähnlich wie beim Blasenkarzinom, keine positive Fluoreszenz.

INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ MIT NIEREN-CA-ZELLEN
FITC-markiertes Antiserum: Antihuman-IgM

Zellen:	Seren:	Kochsalz	Normalperson	Autolog	Allogene Nieren-Ca-Patienten I: T1-3 No Mo	II: T3-4 N1-3/M1	Blasen-Ca-Patienten
Normale Niere		XV 0 ± 0	XII 0 ± 0	XII 1 ± 1	IX 0 ± 0	XII 1 ± 1	VIII 1 ± 1
T 1-3 No Mo		XI 3 ± 4	VIII 0 ± 0	XI 6 ± 6	XII 2 ± 2	IX 2 ± 3	VI 3 ± 4
T3-4 N1-3/M1		VI 0 ± 0	IV 1 ± 1	IV 2 ± 2	V 3 ± 4	VI 3 ± 3	III 2 ± 2

Tab. 18: Indirekte Immunfluoreszenz mit Nieren-Ca-Zellen, FITC-markiertes Antiserum: Antihuman-IgM, römische Ziffern - n-Zahl. Angaben in Prozent positiver Zellen ± Standardabweichungen. Vertikal sind die im Test verwendeten Zellen nach ihrer Stadieneinteilung, horizontal die dazugegebenen Seren aufgetragen.

5.1.5. Nieren-Ca-Zellen, Nachweis von Antitumor-Antikörpern der Klasse IgA in den Seren

Nieren-Ca-Zellen von 2 Patienten der Gruppe I wurden mit den verschiedenen Seren getestet, wobei mit FITC-konjugiertem Antihuman-IgA, alpha-Ketten-spezifisch, Antikörper der Klasse IgA nachgewiesen werden sollten. Das Ergebnis war folgendermaßen:

Patient: (Zellen)	/ Seren:	Kochsalz	Norm. pers.	Auto -log	Allogene Gr. 1	Ni.-CaP. Gr. 2	Blasen- Ca-Pat.
G.K.		o	o	1	o	o	o
L.R.		o	1	1	o	o	o

(Angaben in Prozent positiver Zellen)

Das Ergebnis war in beiden Fällen bei allen Seren negativ. Es konnten keine gegen den Tumor gerichtete Antikörper vom IgA-Typ nachgewiesen werden.

5.1.6. Blasen-Ca-Zellen, Nachweis von F(ab)₂-Fragmenten (Tab. 19)

Bei diesem Versuch wurde als FITC-markierter Antikörper Antihuman-F(ab)₂ verwendet. Auch hier standen leider keine normalen

Urothelien als Vergleichsgewebe zur Verfügung.

In der Gruppe I, bei Zellen niederer Tumorstadien, wurden im autologen Serum (3 %) und bei allogenen Blasen-Ca-Patientenseren (I: 3 %, II: 3 %, III: 4 %) kaum mehr $F(ab)_2$ -Antikörper-Fragmente gefunden als im Serum von normalen Personen (1 %) oder im Serum von Nieren-Ca-Patienten (2 %).

Ganz anders stellte sich die Situation in den Gruppen II und III dar: Bei einem Kochsalzleerwert von 3 % (II) und 5 % (III) unterschieden sich die Seren von Normalpersonen (II: 6 % und III: 9 %) und Nieren-Ca-Patienten (II: 6 % und III: 11 %) signifikant ($p < 0,05$) vom autologen Serum (II: 16 % und 25 % in III) und allogenen Blasen-Ca-Patientenseren (II: 21-14-20 % und III: 33-22-53 %). Dabei war bei allen Seren ein Anstieg der positiven Zellen in der Gruppe III gegenüber der Gruppe II zu verzeichnen.

Auf Tumorzellen höherer Stadien (T4/M1) konnten also mehr $F(ab)_2$ -Antikörperfragmente sichtbar gemacht werden als auf Tumorzellen mittlerer Stadien, und auf diesen wiederum mehr als auf Tumorzellen niederer Stadien.

INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ MIT BLASEN-CA-ZELLEN
FITC-markiertes Antiserum: Anthuman-F(ab)₂

Seren:	Kochsalz	Normalperson	Autolog	Allogene Blasen-Ca-Seren			Nieren-Ca-Patienten
Zellen:				I: Tis No Mo	II: T1-3 No-3 Mo	III: T4/M1	
I	VII	III	VII	V	I	II	III
Tis No Mo	1 ±1	1 ±1	3 ±2	3 ±1	3 ±0	4 ±4	2 ±0
II	XI	X	X	VII	IX	V	VII
T1-3 No-3 Mo	3 ±3	6 ±2	16 ±8	21 ±6	14 ±5	20 ±4	6 ±3
III	VIII	IV	VII	VII	III	V	VI
T4 oder M1	5 ±6	9 ±5	25 ±11	33 ±12	22 ±1	53 ±12	11 ±5

Tab. 19: Indirekte Immunfluoreszenz mit Blasen-Ca-Zellen, FITC-markiertes Antiserum: Anthuman-F(ab)₂, römische Ziffern = n-Zahl. Angaben in Prozent positiver Zellen ± Standardabweichungen. Vertikal sind die im Test verwendeten Zellen nach ihrer Stadieneinteilung, horizontal die dazugegebenen Seren aufgetragen.

1.7. Nieren-Ca-Zellen, Nachweis von F(ab)₂-Fragmenten (Tab. 20)

Gewebe aus dem normalen Teil der Niere zeigte bei allen Seren den gleich niedrigen Prozentsatz F(ab)₂-tragender Zellen, nämlich 1-3 % positive Zellen, was wir als negativ werteten.

Nicht viel höher lagen die Werte bei Zellen der Gruppe I, nur der Wert des autologen Serums ist mit 8 % leicht erhöht. Die gleichen 4 Patienten, bei denen schon im IgG-Nachweis eine hohe Kochsalzkontrolle auffiel, wiesen auch hier wieder 27±15 %

INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ MIT NIEREN-CA-ZELLEN
FITC-markiertes Antiserum: Antihuman-F(ab)₂

Zellen:	Seren:	Kochsalz	Normalperson	Autolog	Allogene Nieren-Ca-Patienten		Blasen-Ca-Patienten
					I: T1-3 No Mo	II: T3-4 N1-3/M1	
		XVII	XIV	XIII	XII	XV	IX
Normale Niere		0 ±0	1 ±1	3 ±2	3 ±4	2 ±1	1 ±2
I T1-3 No Mo	Niedrige Kontrolle ^x	X 3 ±4	IX 3 ±4	VIII 8 ±6	X 3 ±5	VIII 3 ±2	V 1 ±2
	Hohe Kontrolle ^x	27 ±15	39 ±22	59 ±12	56 ±11	57 ±10	34 ±14
		V	IV	III	V	VI	III
T3-4 N1-3/M1		2 ±2	8 ±5	12 ±7	10 ±3	18 ±7	11 ±3

Tab. 20: Indirekte Immunfluoreszenz mit Nieren-Ca-Zellen, FITC-markiertes Antiserum: Antihuman-F(ab)₂, römische Ziffern = n-Zahl. Angaben in Prozent positiver Zellen ± Standardabweichungen. Vertikal sind die im Test verwendeten Zellen nach ihrer Stadieneinteilung, horizontal die dazugegebenen Seren aufgetragen.

^x siehe Text Seite 81 und 83

positive Zellen als Leerwert auf, so daß sie wieder gesondert in einer Zeile erwähnt werden. Auch die höhere Fluoreszenz im autologen Serum (+32 gegenüber der Kochsalzkontrolle) und bei den allogenen Nieren-Ca-Patienten (+29 % und +30 %) gegenüber den Seren von normalen Personen (+12) und von Blasen-Ca-Patienten (+ 7%) unterschied diese 4 Patienten deutlich von den anderen Patienten dieser Gruppe mit niederem Leerwert. In der Gruppe II fiel der Unterschied zwischen autologem Serum (12 %) und allogenen Nieren-Ca-Patienten (I: 10 % und II: 18 %) auf der einen Seite und Serum von gesunden Personen (8 %) und Blasen-Ca-Patienten (11 %) auf der anderen Seite nicht sehr deutlich und auch nicht signifikant aus. Allerdings fand sich bei allen Seren ein Anstieg positiver, d.h. $F(ab)_2$ -Antikörperfragmente tragender Zellen in der Gruppe II im Vergleich zur Gruppe I, ähnlich wie beim Blasenkarzinom, jedoch nicht im selben Ausmaß.

5.2. NACHWEIS VON TUMORZELLEN IN BLASEN - SPÜLUNGEN MITTELS INDIREKTER IMMUN - FLUORESZENZ

Nachdem in Kapitel 5.1.1. gezeigt werden konnte, daß im Serum von Tumorpatienten IgG-Antikörper gegen ihren eigenen Tumor vorhanden sind und daß diese Antikörper auch mit Tumorzellen anderer Patienten mit histologisch gleichem Tumor reagieren, sollte versucht werden, mit Hilfe dieser Antikörper Tumorzellen in Blasenspülflüssigkeiten nachzuweisen. Diese Tumorzellen würden mit Antikörpern aus dem autologen Serum und Serum von Patienten mit gleichem Tumor eine positive Fluoreszenz ergeben, wenn man nach der Sandwich-Technik (der Indirekten Immunfluoreszenz) diese IgG-Antikörper auf dem Tumorzellen durch FITC-markiertes Antihuman-IgG anfärbt. Der Nachweis einer Anzahl solcher immunfluoreszenz positiver Zellen würde also gleichbedeutend sein mit Tumorzellen, da ja keine Antikörper gegen normales Urothel vorhanden sind (Kap. 5.1.1.). Zur Bewertung positiv-negativ siehe Kap. 4.1., S.53 Methodik der Indirekten Immunfluoreszenz.

Nach Abschluß unserer Untersuchungen teilten wir die 20 Patienten nach histologischem und klinischem Befund ein und verglichen das Ergebnis der Papanikolaou-Untersuchung mit dem Ergebnis der Immunfluoreszenz.

HISTOLOGIE UND ZYTOLOGIE DER PATIENTEN MIT BLASENSPÜLUNGEN

Patient:	Probe vom: bei denen ein Karzinom gefunden wurde	Histologie/Klinik:	Zytologie
I. Patienten.			
1. P.J.	29.9.79	T4-G3	Mitteldiff. Urothel-Ca
2. E.A.	3.12.79	T4-G2-3	"
3. F.G.	31.10.79	T2-G3	Enddiff. Urothel-Ca
4. S.J.	5.11.79	T1s-G1	Hoch-mitteldiff. Blasen-Ca
5. M.A.	5.12.79	T2-3 G3	Malignes Tumorreizidiv
6. M.H.	18.3.80	T1s G2	Mitteldiff. Urothel-Ca
7. H.W.	2.10.79	T1s G1, pap. Urothel-Ca	V.a. hochdiff. Urothel-Ca
8. "	9.10.79	"	"
9. L.H.	12.10.79	T1s G3	V.a. Rezidiv eines Urothel-Ca
10. "	31.10.79	"	

II. Patienten, bei denen kein Karzinom gefunden wurde			
11. K.J.	31.10.79	Kein Anhalt für Rezidiv	Keine Tumorzellen nachge- wiesen
12. R.W.	25.1.80	Nekrot. granulomatöse Entzündung, kein Anhalt für Rezidiv	V.a. Rezidiv eines Urothel Ca (mitteldiff.), Zystitis
13. B.A.	11.6.80	Kein Anhalt für Rezidiv, Zystitis	Kein Anhalt für Rezidiv Zystitis
14. S.B.	11.6.80	Kein Anhalt für Rezidiv	Kein Anhalt für Rezidiv
15. S.A.	29.1.80	Kein Anhalt für Karzinom	V.a. mitteldifferenziertes Blasen-Karzinom
16. S.B.	15.1.80	chron.-unspez. Zystitis -klin.: Zystitis, Nephro- lithiasis	Zystitis
17. S.S.	20.5.80	-klin.: chron.-unspez. Entzündung	Kein Anhalt für Tumorzellen
18. G.D.	20.5.80	-klin.: Zystitis, Harn- röhrenstenose	Zystitis
19. G.C.	22.5.80	-klin.: Zystitis (radiatio)	Kein Anhalt für Tumorzellen, Radiatiozystitis
20. M.K.	3.6.80	-klin.: Phäochromozytom	Kein Anhalt für Tumor oder Zystitis
21. B.J.	12.11.79	Zystitis glandularis, v.-Brunn'sche Zellnester	Kein Anhalt für Karzinom

INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ VON BLASENSPÜLUNGEN (BLINDSTUDIE)

(Prozent positiver Zellen)

Patient:	Kochsalz kontrolle	Seren: Norm.per.	Autolog	Allogen (Blasen-Ca)	Allogen (Nieren-Ca)
I. Patienten, bei denen histologisch ein Karzinom gefunden wurde					
1. P.J.	5	16	27	29	-
			26	21	
2. E.A.	4	11	36	17	
			28	31	-
3. F.G.	0	8	13	21	8
				13	
4. S.J.	1	15	49	30	11
5. M.A.	0	7	-	20	5
				10	
6. M.H.	1	9	35	26	18
7. H.W. (2.10)	0	7	18	6	-
			14	20	
8. H.W. (9.10)	0	6	12	6	0
			17	16	
9. L.H. (12.10)	2	5	19	19	8
			22	13	
				22	
10. L.H. (31.10)	0	4	22	19	10
			23	19	

II. Patienten, bei denen histologisch kein Karzinom gefunden wurde				
11. K.J.	0	12	6	8
12. R.W.	0	1	1	5
13. B.A.	2	9	11	5
14. S.B.	0	4	4	3
15. S.A.	0	4	3	5
16. S.B.	1	1	2	10
17. S.S.	1	6	6	13
18. G.D.	0	7	8	5
19. C.C.	0	1	1	2
20. M.K.	0	1	1	0
21. B.J.	0	1	16	2

Die Resultate der Histologie und Zytologie sind in Tabelle 21 dargestellt, die Ergebnisse der Immunfluoreszenz in Tab. 22. Bei 10 Patienten (Nr. 1-10) war histologisch ein Tumor diagnostiziert worden, bei 10 anderen (Nr. 11-20) nicht, sie waren rezidivfrei und/oder es handelte sich um eine Zystitis bzw. eine andere urologische Erkrankung. Ein Patient litt an Zystitis glandularis, einer Metaplasie des Urothels, die als Vorstufe des Adeno-Karzinoms betrachtet wird. In Tab. 23 wurden die Patienten nach ihrer Histologie und Zytologie zu Gruppen zusammengefaßt und deren Immunfluoreszenzergebnisse gemittelt.

INDIREKTE IMMUNFLUORESZENZ MIT ZELLEN AUS BLASENSPUELUNGEN
VERGLEICH MIT HISTOLOGIE UND ZYTOLOGIE NACH PAPANIKOLAOU

HISTOLOGIE	ZYTOLOGIE	n	IMMUNFLUORESZENZ		dazugegebene Seren:			
			Bewertung	Kochsalz	Normalperson	Autolog	Allogene Ca-Patienten Blasen-Ca	Nieren-Ca
Tumorgewebe nachgewiesen	Tumorzellen sicher nachgewiesen	6	positiv	2 ± 2	11 ± 3	31 ± 10	22 ± 7	11 ± 5
	Verdacht auf Tumorzellen	4	positiv	1 ± 1	6 ± 1	17 ± 4	16 ± 6	6 ± 4
Kein Tumorgewebe nachgewiesen - Zystitis/and. urol. Erkr.	2 Pat.: Verdacht auf Tumorzellen 8 Pat.: kein Anh. fuer Tumorzellen	10	negativ	0 ± 1	5 ± 4	4 ± 3	5 ± 3	4 ± 3

Tab. 23:

Angaben bei der Immunfluoreszenz in Prozent positiver Zellen, Bewertung: >10% - positiv, <10% - negativ.

1. Patienten mit histologisch nachgewiesenem Karzinom

- a) Bei sechs solcher Patienten (60 %) konnte auch der Zytologe Tumorzellen in der Blasen-spülung sicher nachweisen (s.Tab. 23). Die Immunfluoreszenz mit dem autologen (31 %) und den allogenen Blasen-Ca-Patienten-Seren (22 %) zeigt signifikant ($p < 0,01$) höhere Werte als mit Seren von gesunden Personen (11 %) und von Nieren-Ca-Patienten (11 %).
- b) Bei vier Proben (40 %) äußerte der Zytologe nur den Verdacht auf Tumorzellen. Die Immunfluoreszenz ergab im autologen Serum (17 %) und in Seren anderer Blasen-Ca-Patienten (16 %) positive Werte, die sich signifikant ($p < 0,01$) von Seren gesunder Personen und von Nieren-Ca-Patienten (je 6 %) unterschieden. Der Prozentsatz positiver Zellen war allerdings nicht so hoch wie bei den oben erwähnten sechs Patienten.

2. Patienten ohne histologisch nachgewiesenem Karzinomgewebe, mit Zystitis oder anderen urologischen Erkrankungen

Hier war in der Indirekten Immunfluoreszenz kein Unterschied zwischen autologem Serum und allogenen Blasen-Ca-Patienten-Seren auf der einen und gesunden Personen- und Nieren-Ca-Patienten-Seren auf der anderen Seite feststellbar. Der Prozentsatz positiver Zellen war zudem sehr niedrig und wurde durchwegs als negativ gewertet (4-5%). Unter den Patienten, bei denen histologisch kein Rezidiv gefunden wurde, befanden sich auch zwei, bei denen der Zytologe den Verdacht auf das Vorliegen eines mitteldifferenzierten Karzinoms äußerte. In dem einen Fall handelte

es sich um eine nekrotisierende-granulomatöse Entzündung,
in dem anderen um eine chronische, unspezifische Zystitis.

3. Ein Patient mit Zystitis glandularis

Das Ergebnis dieses Patienten (Nr. 21 in Tab. 21) möchte
ich gesondert erwähnen (Prozentsatz positiver Zellen):

Patient:	Kochsalz- kontrolle	Serum v. Nor.per.	Autologes Serum:	Allogenes Blasen-Ca- Pat.-Serum:
B.J.	0	1	16	6

Histologisch wurde eine Zystitis glandularis mit Vermehrung
drüsenähnlicher (sog. v.-Brunnscher) Zellnester in der Sub-
mukosa gefunden. Hierbei handelt es sich um eine Metaplasie
der Blasenschleimhaut, die als eine Vorstufe des Adeno-Karzinoms
aufgefaßt wird. In der Immunfluoreszenz wurden im autologen
Serum 16 % positive Zellen gefunden, während die Fluoreszenz
mit dem Serum einer gesunden Person (1 %) und dem Serum eines
Patienten mit Blasen-Ca (6 %) im negativen Bereich blieb.

4. Ein Nierenkarzinom-Patient

Die Blasenspülung eines Nieren-Ca-Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium T4 (U.a. Tumoreinbruch in das Nierenbecken) wurde ebenfalls, außerhalb der Blindstudie, mit der gleichen Methodik untersucht. Das Ergebnis (Prozentsatz positiver Zellen):

Patient:	Kochsalz- kontrolle	Serum v. Norm.pers.	Autologes Serum:	Allogenes Nieren-Ca- Pat.-Serum:
St.F.	0	7	19	16

Der Prozentsatz positiver Zellen im Test mit dem autologen Serum und auch mit dem Serum eines anderen Nieren-Ca-Patienten weisen auf das Vorhandensein von Tumorzellen in der Blasenspülung hin.

5.3. BESTIMMUNG DER GESAMTLYMPHOZYTEN ===== UND DIFFERENZIERUNG IN T- UND B-LYMPHO- ===== Z Y T E N =====

GESAMTLYMPHOZYTENZAH, T- UND B-LYMPHOZYTENANTEIL BEI BLASEN- UND NIERENKARZINOMPATIENTEN

		Gesamtlympho- zyten/ μ l	T-Lymphozyten (%)	B-Lymphozyten (%)
Normalwerte	nach (E)	1000 - 4000	76 (60 - 90)	14 (5 - 33)
	eigene Kontrollgr.	-	67 (55 - 77)	17 (14 - 20)
Blasen-Ca- Patienten	A: T1s-2 No Mo	1446 $\pm$ 270 VI	53 $\pm$ 10 XXIII	24 $\pm$ 9 XXVI
	B: T3-4 N1-3/M1	1348 $\pm$ 519 III	53 $\pm$ 13 XIV	23 $\pm$ 10 XIV
Nieren-Ca- Patienten	I: T1-3 No Mo	1317 $\pm$ 676 XII	52 $\pm$ 12 X	15 $\pm$ 6 XI
	II: T3-4 N1-3/M1	816 $\pm$ 353 VII	52 $\pm$ 11 X	19 $\pm$ 6 IX

Tab. 24:

n - Zahlen in roemischen Ziffern.

Signifikanter Unterschied zwischen Nieren-Ca-Patienten I und II, Gesamtlymphozytenzahl ($p < 0,05$)

5.3.1. Gesamtlymphozytenzahl

Im Vergleich zum Normalbereich von 1000-4000 Lymphozyten/ μ l sind die Gesamtlymphozyten bei allen Blasen- und Nieren-Ca-Patienten im unteren Grenzbereich einzuordnen. Bei den Blasen-Ca-Patienten lassen sich keine Stadienunterschiede feststellen: Die in Gruppe A zusammengefaßten niederen Tumorstadien Tis-T2 NO MO erreichen durchschnittlich 1446 ± 270 , die Gruppe B mit den fortgeschrittenen Stadien T3-4 oder mit Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen 1348 ± 519 Lymphozyten/ μ l. Diese Werte wurden aus der Klinik übernommen, die niedrigen Fallzahlen erklären sich daraus, daß bei Patienten mit Urothelkarzinom nicht routinemäßig ein Differentialblutbild angefertigt wurde. Bei den Nieren-Ca-Patienten ist im fortgeschrittenen Tumorstadium ein signifikanter Abfall der Gesamtlymphozyten (816) gegenüber den Anfangsstadien (1317) festzustellen ($p < 0,05$).

5.3.2. T-Lymphozyten-Anteil

Der prozentuale T-Lymphozytenanteil ist sowohl bei den Blasen- als auch bei den Nieren-Ca-Patienten deutlich vermindert. Gesunde Erwachsene haben bei der von uns verwendeten Rosettenmethode (8) einen durchschnittlichen T-Zell-Anteil von 76 % (60-90 %). Unsere Kontrollgruppe gesunder Personen erreichte im Durchschnitt 67 % T-Zellen (55-77 %). Dagegen fanden wir bei den Blasen- und Nierenkarzinom-Patienten einen deutlich erniedrigten Mittelwert von 52-53 %. Keine Unterschiede konnten

zwischen den verschiedenen Tumorstadien festgestellt werden.

5.3.3. B-Lymphozyten-Anteil

Der Normwert für den B-Lymphozyten-Anteil, bestimmt durch direkte Immunfluoreszenz, beträgt für gesunde Personen 14 % (5-33 %, nach 8).

Eine Vergleichsgruppe, die wir untersuchten, erzielte durchschnittlich 17 % (14-20 %). Darüber lagen unsere Werte für Blasen-Ca-Patienten, sowohl die Stadien I (24 %) als auch die fortgeschrittenen Stadien II (23 %).

Ein leichter Anstieg des B-Lymphozyten-Anteils mit dem Tumorstadium wurde bei den Nieren-Ca-Patienten festgestellt: die niederen Stadien I (15 %) lagen etwas unter den fortgeschrittenen Stadien II (19 %).

Insgesamt läßt sich der B-Lymphozyten-Anteil bei den von uns untersuchten Ca-Patienten im oberen Normbereich einordnen.

Bei dem Patienten S.J., bei dem zusätzlich zum Blasen-Ca noch ein Prostata-Ca und eine Chronisch Lymphatische Leukämie gefunden wurde, erhielten wir folgende Werte:

Gesamtleukozyten:	30.400 / μ l
Gesamtlymphozyten:	24.320 / μ l = 80 % der Leukozyten
T-Lymphozyten:	3.648 / μ l = 15 % der Lymphozyten
B-Lymphozyten:	486 / μ l = 2 % " "

5.4. SUPPRESSOR-ZELL-AKTIVITÄT VON =====

LYMPHOZYTEN BEI BLASEN- UND NIEREN- =====

KARZINOMPATIENTEN SOWIE BEI VER- =====

GLEICHSGRUPPEN =====

Als Suppressor-Zell-Aktivität (=SZA), berechnet nach der in der Methodik (S.68) angegebenen Formel, wird die Fähigkeit von Lymphozyten bezeichnet, die Proliferation anderer Lymphozyten zu unterdrücken. Sie gibt den Prozentsatz wieder, der sich aus dem Vergleich eines Proliferationstestansatzes ohne "Suppressor"-Lymphozyten mit einem Testansatz mit Suppressorzellen ergibt. Ein negatives Vorzeichen vor dem Testergebnis bedeutet, daß die Proliferation von Lymphozyten durch die Suppressorzellen unterdrückt wurde, -10 % bedeutet beispielsweise eine geringe, -50 % eine hohe Suppressor-Zell-Aktivität. Ein Plus vor dem Ergebnis dagegen heißt, daß die Proliferation von Lymphozyten von den "Suppressorzellen" nicht inhibiert, sondern stimuliert wurde.

Als Proliferationsanreiz dienten, wie schon in der Methodik geschildert, die Mitogene Concanavalin A (ConA), Phytohämagglutinin (PHA), und Pokeweed Mitogen (PWM), ferner Lymphozyten einer anderen Person als stimulierendes Antigen in der Gemischten Lymphozyten-Kultur (MLC). Die Suppressor-Zell-Aktivität wurde

also in vier verschiedenen Testen untersucht, wobei die Targetzellen jeweils auf eine andere Art stimuliert wurden. Außerdem wurde die Suppressor-Zell-Aktivität jeweils mit zwei, auf verschiedene Weisengewonnenen Suppressorzellen bestimmt:

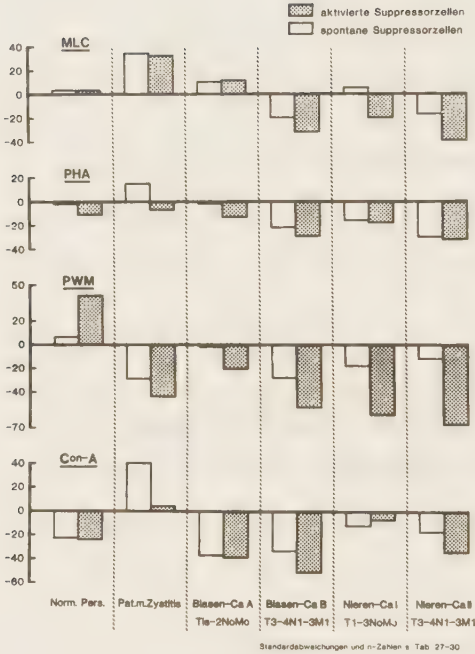
1. Bei der "spontanen" Suppressor-Zell-Aktivität (=SSZ) wurden die zu testenden Lymphozyten 2 Tage ohne Zusatzmittel inkubiert. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß nach einer Zeitspanne von 48-72 h die suppressive Aktivität ihr Optimum erreicht.
2. Als "aktivierte" Suppressorzellen (=ASZ) wurden Lymphozyten bezeichnet, die 2 Tage mit dem Mitogen ConA inkubiert wurden, in der Erwartung, daß dieses präexistente Lymphozyten mit supprimierenden Eigenschaften zu höherer Aktivität anregt.

Die Tabelle 25 zeigt, welche verschiedenen Patientengruppen auf ihre Suppressor-Zell-Aktivität getestet wurden.

Tab. 25: Patientengruppen, deren Lymphozyten auf ihre Suppressor-
Zell-Aktivität getestet wurden

1. Normalpersonen
 2. Patienten mit Zystitis
 3. Blasen-Ca-Patienten der Gruppe A (Tis-2 No Mo)
 4. Blasen-Ca-Patienten der Gruppe B (T3-4 oder N1-3/M1)
 5. Nieren-Ca-Patienten der Gruppe I (T1-3 No Mo)
 6. Nieren-Ca-Patienten der Gruppe II (T3-4 N1-3 oder M1)
-

Eine Synopsis der Ergebnisse aus allen vier Testansätzen
in Form einer graphischen Darstellung bietet die Tab. 26



Tab. 26: Synopsis der Suppressor-Zell-Aktivität

5.4.1. Einfluß von Suppressorzellen auf eine Gemischte Lymphozyten Kultur (s. Tab. 27)

In unserem Experiment zeigen Lymphozyten von Normalpersonen keine Suppression, sondern eine Stimulation, und zwar gleich ob spontan ($+3 \pm 24$) oder aktiviert ($+3 \pm 27$). Eine noch stärker ausgeprägte Stimulation zeigen die Patienten mit Zystitis, die SSZ stimulieren die Proliferation der Targetzellen um $+34 \pm 28$, die ASZ um $+32 \pm 34$.

Auch Blasen-Ca-Patienten der niederen Stadien A zeigen eine Stimulation (SSZ: $+10 \pm 28$, ASZ: $+11 \pm 22$), die etwas höher liegt als die der Normalpersonen. Bei Blasen-Ca-Patienten höherer Stadien (B) finden wir hingegen eine supprimierende Aktivität. SSZ von diesen Patienten verminderten die Proliferationstätigkeit der Targetzellen um -20 ± 29 , ASZ um -32 ± 22 . Die Aktivität der SSZ ist signifikant höher als bei Lymphozyten von Blasen-Ca-Patienten Gruppe A und von Zystitis-Patienten. Die ASZ unterscheiden sich ebenso signifikant von diesen beiden Gruppen wie von Normalpersonen.

Tab. 27:

SUPPRESSOR-ZELL-AKTIVITÄT (SZA) BEI BLASEN- UND NIERENKARZINOM-
PATIENTEN SOWIE BEI VERGLEICHSGRUPPEN (IN %)

1. GEMISCHTE LYMPHOZYTEN KULTUR
=====

Patientengruppen:	n	SSZ:	n	ASZ:
1 Normalpersonen	5	+3 <u>+24</u>	5	+3 <u>+27</u>
2 Zystitis-Pat.	8	+34 <u>+28</u>	8	+32 <u>+34</u>
3 Blasen-Ca-Pat. A (Tis-2 No Mo)	12	+10 <u>+28</u>	11	+11 <u>+22</u>
4 Blasen-Ca-Pat. B (T3-4 N1-3/M1)	6	-20 <u>+29</u>	7	-32 <u>+22</u>
5 Nieren-Ca-Pat. I (T1-3 No Mo)	4	+5 <u>+27</u>	5	-20 <u>+16</u>
6 Nieren-Ca-Pat. II (T3-4 N1-3/M1)	5	-17 <u>+28</u>	4	-39 <u>+25</u>
Signifikante Unterschiede	2 von 4 $p < 0,01$ 2 von 6 $p < 0,01$ 3 von 4 $p < 0,05$		1 von 4 $p < 0,05$ 1 von 6 $p < 0,05$ 2 von 4 $p < 0,01$ 2 von 5 $p < 0,01$ 2 von 6 $p < 0,01$ 3 von 4 $p < 0,01$ 3 von 6 $p < 0,01$	
Signifikanz grenzwertig	1 von 2 2 von 3 2 von 5 3 von 6		2 von 3 3 von 5 1 von 2	

Ähnliches ließ sich auch bei den Nieren-Ca-Patienten feststellen: Lymphozyten von Patienten ohne Metastasen (I) zeigen spontan einen ähnlichen Wert ($+5 \pm 27$) wie Lymphozyten von Blasen-Ca-Patienten ohne Metastasen (A). Die ASZ wiesen jedoch schon deutlich eine Suppression auf (-20 ± 16 , signifikanter Unterschied zu den Zystitis-Patienten), während die Blasen-Ca-Patienten der vergleichbaren Stadien A noch um $+11 \pm 22$ stimulierten. Im fortgeschrittenen Tumorstadium entsprachen die Ergebnisse der Nieren-Ca-Patienten (SSZ: -17 ± 28 , ASZ: -39 ± 25) denen der Blasen-Ca-Patienten der Gruppe B. Die ASZ zeigten dabei signifikante Unterschiede zu den Lymphozyten von Normalpersonen, von Zystitis-Patienten und Blasen-Ca-Patienten der Gruppe A.

5.4.2. Einfluß von Suppressorzellen auf durch PHA stimulierte allogene Lymphozyten (s. Tab. 28)

Lymphozyten von Normalpersonen hatten auf einen Testansatz allogener Lymphozyten mit dem Mitogen PHA einen leicht suppressierenden Einfluß (SSZ: -2 ± 11 , ASZ: -11 ± 20). Patienten mit Zystitis wiesen in ihren SSZ eine stimulierende Wirkung auf ($+15 \pm 33$), während sich bei den ASZ schon eine Suppression zeigte (-7 ± 29).

Lymphozyten von Blasen-Ca-Patienten der Stadien A wiesen nahezu die gleichen Ergebnisse auf wie Normalpersonen (SSZ: -1 ± 29 , ASZ: -13 ± 24). Ein deutlicher Anstieg der SZA fand sich bei den fortgeschrittenen Stadien B. Hier bewirkten die SSZ eine Suppression von -22 ± 20 , ein signifikanter Unterschied zu Lymphozyten der Zystitis-Patienten, und die ASZ eine Suppression von -29 ± 24 . Dieser Anstieg in der Gruppe B im Vergleich zur Gruppe A war jedoch nicht signifikant.

Ein ähnlicher, ebenfalls nicht signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (fortgeschrittene und niedrigere Tumorstadien) konnte bei den Nieren-Ca-Patienten nachgewiesen werden: Bereits bei Lymphozyten der Stadien I fand sich eine höhere SZA (SSZ: -16 ± 26 , ASZ: -18 ± 29) als bei den vergleichbaren Blasen-Ca-Patienten (A). Auch hier konnte ein weiterer deutlicher Anstieg der Suppression bei den Patienten mit metastasierendem Karzinom (II) nachgewiesen werden (SSZ: -30 ± 24 , ASZ: -32 ± 26). Die spontane SZA der Nieren-Ca-Patienten II zeigte signifikante Unterschiede zu Normalpersonen, Zystitis-Patienten und Blasen-Ca-Patienten der Gruppe A.

Tab. 28:

SUPPRESSOR-ZELL-AKTIVITÄT (SZA) BEI BLASEN- UND NIERENKARZINOM-
PATIENTEN SOWIE BEI VERGLEICHSGRUPPEN (IN %)

2. PHA-TESTANSATZ

Patientengruppen:	n	SSZ:	n	ASZ:
1 Normalpersonen	2	-2 <u>+11</u>	2	-11 <u>+20</u>
2 Zystitis-Pat.	5	+15 <u>+33</u>	4	-7 <u>+29</u>
3 Blasen-Ca-Pat. A (Tis-2 No Mo)	17	-1 <u>+29</u>	14	-13 <u>+24</u>
4 Blasen-Ca-Pat. B (T3-4 N1-3/M1)	7	-22 <u>+20</u>	8	-29 <u>+24</u>
5 Nieren-Ca-Pat. I (T1-3 No Mo)	4	-16 <u>+26</u>	3	-18 <u>+29</u>
6 Nieren-Ca-Pat. II (T3-4 N1-3/M1)	9	-30 <u>+24</u>	6	-32 <u>+26</u>
Signifikante Unterschiede	1 von 6 $p < 0,05$ 2 von 4 $p < 0,05$ 2 von 6 $p < 0,01$ 3 von 6 $p < 0,05$		-	
Signifikanz grenzwertig	2 von 5		-	

5.4.3. Einfluß von Suppressorzellen auf durch PWM stimulierte
allogene Lymphozyten (s. Tab. 29)

Auf einen Testansatz allogener Lymphozyten, die mit PWM zur Proliferation angeregt wurden, wirkten die Lymphozyten von Normalpersonen, vor allem die ASZ, stimulierend (SSZ: +6 % $\pm$ 13, ASZ: +41 % $\pm$ 24).

Die Stimulation durch ASZ von Normalpersonen unterscheidet sich signifikant von allen anderen Gruppen.

Eine ganz andere Wirkung entfalteten Lymphozyten von Zystitis-Patienten. Im Gegensatz zur MLC und zur PHA-Stimulation fand sich hier eine ausgesprochene Suppression, und zwar bei den SSZ -29 % $\pm$ 37 und bei den ASZ sogar -44 % $\pm$ 29.

SSZ von Blasen-Ca-Patienten, Stadien A, supprimierten nur um -1 % $\pm$ 38, ASZ um -20 % $\pm$ 24, was in etwa dem Ergebnis der durch PHA stimulierten Kultur entspricht. Allerdings ergab sich bei der PWM-Stimulation ein noch deutlicher Anstieg der SZA bei Patienten in den Stadien B: SSZ: -28 % $\pm$ 24, ASZ: -53 % $\pm$ 26; der Unterschied zu Blasen-Ca-Patienten Gruppe A ist signifikant.

Deutliche Unterschiede zwischen ASZ und SSZ konnten bei Nieren-Ca-Patienten der Stadien I und II nachgewiesen werden. Lag die Aktivität der SSZ bei den Stadien I mit -18 % $\pm$ 33 und bei den Stadien II mit -12 % $\pm$ 8 in der gleichen Größenordnung, so stieg die Aktivität der ASZ in den Stadien I auf -59 % $\pm$ 9 und in den Stadien II auf -67 %. Hier müssen allerdings die geringen

n-Zahlen in PWM- Test berücksichtigt werden, die keine sicheren Aussagen und auch keine Signifikanzen erkennen lassen.

Tab. 29:

SUPPRESSOR-ZELL-AKTIVITÄT (SZA) BEI BLASEN- UND NIERENKARZINOM-
PATIENTEN SOWIE BEI VERGLEICHSGRUPPEN (IN %)

3. PWM-TESTANSATZ

=====

Patientengruppen:	n	SSZ:	n	ASZ:
1 Normalpersonen	2	+6 <u>+13</u>	1	+41 <u>+24</u>
2 Zystitis-Pat.	6	-29 <u>+37</u>	5	-44 <u>+29</u>
3 Blasen-Ca-Pat. A (Tis-2 No Mo)	15	-1 <u>+38</u>	11	-20 <u>+24</u>
4 Blasen-Ca-Pat. B (T3-4 N1-3/M1)	4	-28 <u>+24</u>	4	-53 <u>+26</u>
5 Nieren-Ca-Pat. I (T1-3 No Mo)	3	-18 <u>+33</u>	2	-59 <u>+9</u>
6 Nieren-Ca-Pat. II (T3-4 N1-3/M1)	3	-12 <u>+8</u>	1	-67
Signifikante Unterschiede	-		1 von 2	p<0,01
			1 von 3	p<0,01
			1 von 4	p<0,01
			1 von 5	p<0,01
			1 von 6	p<0,01
			3 von 4	p<0,05
Signifikanz grenzwertig	1 von 2		3 von 2	
	1 von 4		3 von 5	
	2 von 3		3 von 6	

5.4.4. Einfluß von Suppressorzellen auf ConA stimulierte allogene Lymphozyten (s. Tab. 30)

Der Suppressions-Effekt von Lymphozyten auf den Testansatz von allophenen Lymphozyten mit dem Mitogen ConA fiel auf bei der Gruppe der Normalpersonen im Vergleich zu den drei schon beschriebenen Tests. Die SSZ supprimierten um $-23 \% \pm 7$, die ASZ um $-24 \% \pm 8$.

Auch hier verhielten sich die Zystitis-Patienten anders: Sie induzierten eine Stimulation: SSZ um $+40 \% \pm 25$, ASZ um $+4 \% \pm 10$. Die Stimulation durch die SSZ unterscheidet sich signifikant von allen anderen Gruppen, ebenso die Stimulation durch ASZ, mit einer Ausnahme, nämlich den Nieren-Ca-Patienten Gruppe I. Dagegen blieben die Blasen-Ca-Patienten im Rahmen der schon beschriebenen Tests. In den Stadien A zum Beispiel erreichten die SSZ einen Suppressionswert von $-37 \% \pm 26$, den die ASZ nicht mehr steigerten ($-38 \% \pm 25$). Auch die SSZ der Stadien B bewegten sich mit $-33 \% \pm 26$ in diesem Bereich, und nur die ASZ der Patienten in fortgeschrittenen Stadien wiesen einen Anstieg ihrer SZA auf mit $-51 \% \pm 22$, signifikant unterschiedlich von den ASZ der Normalpersonen.

Bei der Blastentransformation durch das Mitogen ConA zeigten die Lymphozyten von Blasen-Ca-Patienten eine höhere suppressive Aktivität als die von Nieren-Ca-Patienten, abweichend von den anderen Testen.

Diese blieben in den Stadien I sogar unter dem Wert der Normalpersonen; die ASZ ($-7 \% \pm 17$, was signifikant unter dem Wert beider Blasen-Ca-Patienten-Gruppen liegt) unterdrückten die Proliferation sogar noch etwas weniger als die SSZ ($-12 \% \pm 25$), ein Ergebnis, das von den anderen abweicht.

Eine höhere Suppression wiesen wieder die Lymphozyten der Nieren-Ca-Patienten in den Stadien II auf. Vor allem die ASZ ($-34 \% \pm 12$) supprimierten deutlich höher im Vergleich zu den ASZ der Patienten in den Stadien I. Die SSZ unterschieden sich dagegen nur geringfügig ($-17 \% \pm 32$) von denen der Stadien I-Patienten und lagen auch noch unter den Werten der Normalpersonen.

Tab. 3o:

SUPPRESSOR-ZELL-AKTIVITÄT (SEA) BEI BLASEN- UND NIERENKARZINOM-
PATIENTEN SOWIE BEI VERGLEICHSGRUPPEN (IN %)

4. CONA-TESTANSATZ
=====

Patientengruppen:	n	SSZ:	n	ASZ:
1 Normalpersonen	2	-23 $\pm$ 7	2	-24 $\pm$ 8
2 Zystitis-Pat.	4	+40 $\pm$ 25	3	+4 $\pm$ 10
3 Blasen-Ca-Pat. A (Tis-2 No Mo)	14	-37 $\pm$ 26	14	-38 $\pm$ 25
4 Blasen-Ca-Pat. B (T3-4 N1-3/M1)	9	-33 $\pm$ 26	9	-51 $\pm$ 22
5 Nieren-Ca-Pat. I (T1-3 No Mo)	3	-12 $\pm$ 25	3	-7 $\pm$ 17
6 Nieren-Ca-Pat. II (T3-4 N1-3/M1)	6	-17 $\pm$ 32	5	-34 $\pm$ 12
Signifikante Unterschiede	2 von 1 $p < 0,01$ 2 von 3 $p < 0,01$ 2 von 4 $p < 0,01$ 2 von 5 $p < 0,01$ 2 von 6 $p < 0,01$		1 von 2 $p < 0,05$ 1 von 4 $p < 0,05$ 2 von 3 $p < 0,01$ 2 von 4 $p < 0,01$ 2 von 6 $p < 0,01$ 3 von 5 $p < 0,05$ 4 von 5 $p < 0,01$	
Signifikanz grenzwertig	3 von 5 3 von 6		5 von 6	

6. DISKUSSION

6.1 INDIREKTE IMMUNFLUORESZENZ MIT TUMOR- UND VERGLEICHSGEWEBE, NACHWEIS VON ANTITUMORANTIKÖRPERN

6.1.1. Zur Methodik

Um die humorale Antwort des Wirtsorganismus gegen einen Tumor darzustellen, wählten wir die indirekte Membranimmunfluoreszenz. Diese Technik eignet sich besonders gut zum Studium antigener Determination auf Zelloberflächen lebender Zellen. Die Immunfluoreszenz wurde von Coons in den vierziger und fünfziger Jahren entwickelt (28,29) und zeichnet sich durch hohe Empfindlichkeit und Spezifität im Vergleich zu anderen immunologischen Methoden wie Präzipitation, Immundiffusion, Immunelektrophorese, Komplementbindungsreaktion, u.a. aus. Ein höherer Empfindlichkeitsgrad wird nur noch durch den Radio- bzw. Enzymimmunoassay erreicht. Solche Testsysteme stehen der Tumorummunologie in Ermangelung eines isolierten, reinen tumorspezifischen Antigens nicht zur Verfügung.

Die Membranimmunfluoreszenz hat sich mittlerweile in der Erforschung von Tumorantigenen und auch von Tumorantikörpern zur Routine etabliert. Da diese Methode auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion beruht, ist es möglich beide Reaktionspartner damit nachzuweisen:

- bei vorgegebenem Antigen kann man nach dazu passenden spezifischen Antikörpern im Serum suchen. Wir verwendeten Blasen- und Nierenkarzinom als Antigen und suchten in verschiedenen Seren nach Antikörpern.

- mit bekannten, positiven Seren lassen sich Tumorzellen als solche identifizieren: Dieses Prinzip verwendeten wir, indem wir im Sediment von Blasenspülungen mit seinen verschiedenen Zellarten mit Hilfe von Antikörper-positiven Seren nach Tumorzellen suchten.

Die Auswertung erlaubt unterschiedliche Methoden: Viele Autoren beschränken sich auf die Aussage positiv/negativ. Eine andere Möglichkeit besteht in der Angabe des Serumverdünnungstiters, bei dem die Reaktion noch positiv ausfällt. Bestrebungen, die Methodik der Immunfluoreszenz noch weiter zu objektivieren und zu quantifizieren, führten zur Entwicklung von Mikrospektrofluorimetern, die die Helligkeit und die Farbanteile des emittierten Fluoreszenzlichts zahlenmäßig festlegen (85). Phillip und Lewis treffen zuerst die Entscheidung positiv/negativ bei einer Serumverdünnung 1:4. Seren, die bei dieser Verdünnung positiv reagierten, werden weiter austitriert. Wir verdünnten alle Seren 1:10 und versuchten zu einer halbquantitativen Aussage über die Antikörpermenge im Serum zu gelangen, indem wir den

Prozentsatz positiver Zellen ermittelten.

Bis zu 10 % positiver Zellen bewerteten wir als negativ, um eine nicht ganz zu vermeidende unspezifische Fluoreszenz an einzelnen Zellen auszuschließen. Unspezifische Fluoreszenz kann beispielsweise verursacht werden durch freies, nicht an Globuline gebundenes Fluorochrom, das sich dann wie ein ganz gewöhnlicher histologischer Farbstoff verhält, durch Autofluoreszenz von Geweben und durch die Tatsache, daß Konjugate nicht immer aus reinen Antikörperfraktionen, sondern auch zu einem geringen Teil aus anderen Proteinen bestehen, die ebenfalls Fluorochrom binden und unspezifisch Gewebe anfärben können.

Wichtig ist, daß die zu untersuchenden Patientenserum mindestens 1:10 verdünnt werden, da bei zu hohen Serumkonzentrationen sich neben den spezifischen Antikörpern auch noch zahlreiche andere Serumproteine an das Präparat binden, darunter auch Gammaglobuline, die nicht zur Antikörperfraktion gehören. Diese können oft nicht vollständig herausgewaschen werden und binden dann ebenfalls Konjugat (152).

Erkannt werden diese Fehlerquellen durch die Kochsalzkontrolle, in der wir meistens 2-5 % positiver Zellen fanden, so daß wir ein Präparat erst ab 10 % als positiv bewerteten.

Der Prozentsatz positiver Präparate bewegte sich in den meisten Fällen zwischen 20 % und 50 %. Es verbleibt somit auch in den positiven Präparaten noch ein relativ großer Prozentsatz fluoreszenznegativer Zellen. Bei diesen könnte es sich handeln um:

a) Tumorzellen ohne solche Membranantigene, die von Antitumorantikörpern erkannt werden könnten. Ein solcher Verlust tumorspezifischer bzw. tumorassoziierter Antigene wird ja als einer der Mechanismen für das "Escape"-Phänomen diskutiert.

b) Normale Parenchymzellen oder Bindegewebszellen, die sich noch unter den Tumorzellen befinden.

Als Testkontrolle wurde noch ein Präparat mit Kochsalz anstelle von Serum mitgeführt. Abgesehen vom Ausschluß unspezifischer Fluoreszenz sollte auch festgestellt werden, ob nicht schon ohne Serum eine Reaktion zwischen Tumorzellen und FITC-konjugierten Antiseren stattfindet, was der Fall wäre, wenn schon vor dem Test menschliche Antikörper auf den Tumorzellen säßen. Man kann diese Kochsalzkontrolle auch als direkte Immunfluoreszenz ohne Zwischenschaltung eines Serums auffassen, sie diene gewissermaßen als "Leerwert" für die Tests mit den Seren.

6.1.2. Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieses Tests war es, Antitumor-Antikörper im Serum von Blasen- und Nieren-Ca-Patienten nachzuweisen, diese zu klassifizieren (IgG-IgM-F(ab)₂-Fragment) und das Auftreten evtl. vorhandener Antitumorantikörper bestimmten Stadien zuzuordnen. Ferner sollte geprüft werden, ob diese Antikörper auch Kreuzreaktionen mit normalem Urothel bzw. normalem Nierengewebe zeigen.

Unser wichtigstes Ziel aber war es vorhandene Antikörper näher zu spezifizieren:

- a) sind sie individualspezifisch: gibt es nur eine positive Reaktion von Tumorzellen mit dem autologen Serum und nicht mit allogenen Seren?
- b) sind sie tumorspezifisch: reagieren Tumorzellen auch mit allogenen Seren von Patienten mit dem histologisch gleichem Tumor positiv, nicht aber mit Seren von Patienten mit histologisch anderem Tumor?
- c) sind sie tumorassoziiert: tauchen sie zwar bei Karzinompatienten, wenn auch von histologisch verschiedenen Tumoren auf, aber nicht bei Normalpersonen und sind diese Antikörper gegen maligne Zellen gerichtet und nicht gegen normale Zellen? Diese Definition von tumorassoziierten Antikörpern schlug Ackermann vor (1).

In keinem Serum konnten wir Antikörper gegen normales Urothel oder gegen normale Niere nachweisen. Das Urothelgewebe reichte leider nur aus, um nach IgG-Antikörpern zu suchen, aber dieser Test war ebenso negativ wie die Suche nach IgG-Antikörpern gegen normales Nierengewebe. Von diesem verfügten wir über umfangreicheres Material,

so daß wir auch nach IgM-Antikörpern und F(ab)₂-Antikörperfragmenten gegen normale Niere suchen konnten. Aber auch diese Tests blieben negativ.

Pascal und Mitarbeiter (116) wiesen elektromikroskopisch und mit Hilfe der Immunfluoreszenz von Gefrierschnitten in Nieren verschiedener Tumorpatienten an den Basalmembran der Glomerula subendotheliale Depots von Immunkomplexen aus Tumorantigenen und korrespondierenden Antikörpern nach. Die Nierenglomerula wirkten offensichtlich als Filter für diese zirkulierenden Immunkomplexe. Wir konnten kein Tumorantigen in den normalen Nierenanteilen der Nieren-Ca-Patienten nachweisen, da wir mit Einzelzellsuspensionen von Nierenzellen arbeiteten und nicht mit Gewebeschnitten (negative Ergebnisse der Kochsalzkontrolle mit normalem Nierengewebe).

Erfolgreich war unsere Suche nach Antitumor-Antikörpern vom IgG-Typ gegen Blasentumorzellen (Tab. 15). Sie ließen sich im autologen Serum, aber auch in allogenen Seren von Patienten mit Blasen-Ca in der gleichen Größenordnung nachweisen, man kann sie also nicht als individualspezifisch, sondern muß sie als gruppenspezifisch bezeichnen. Aus der Tatsache, daß wir mit allogenen Seren von Nieren-Ca-Patienten und Normalpersonen nur einen Prozentsatz von 8-12 % positiver Zellen fanden, der sich deutlich vom autologen Serum und von den Seren der anderen Blasen-Ca-Patienten unterschied, schließen wir, daß diese IgG-Antikörper tumorspezifisch sind.

Die 8-12 % positiven Zellen im Präparat mit Normalpersonen- und Nieren-Ca-Patienten-Seren, die wir an der Grenze zu einem schwach positiven Ergebnis einordnen, könnten möglicherweise einem Basisspiegel von IgG-Antikörpern gegen Blasen-Ca-Antigen entsprechen. Diese müßten dann präformiert von Natur aus vorhanden sein, da das Immunsystem dieser Patienten ja noch keinen Kontakt mit Blasentumorantigen hatte. Zu diesem möglichen Antikörper-Basisspiegel kämen dann bei den Blasen-Ca-Patienten noch spezifische Antitumor-Antikörper hinzu, die erst durch den Kontakt mit dem Tumor gebildet werden.

Ferner wollten wir feststellen, ob die gefundenen IgG-Antitumor-Antikörper stadiumsabhängig sind. Schon bei den Patienten der Gruppe I, die den Stadien Tis No Mo mit intakter Basalmembran entspricht, waren Antikörper gegen den Tumor nachzuweisen. Einen leichten Anstieg des Prozentsatzes positiver Zellen, den wir ja als halbquantitatives Maß für die Antikörpermenge betrachten, konnten wir über die Gruppe II zu den fortgeschrittenen Tumoren der Gruppe III hin sowohl im autologen Serum als auch in den Seren allogener Blasen-Ca-Patienten feststellen. Schmidt und Mitarbeiter (126) führten eine quantitative Bestimmung von IgG, IgA und IgM mittels Radialer Immundiffusion bei Patienten mit Blasen-, Nieren-, Prostata- und Hodenkarzinom durch und konnten weder Unterschiede in den Tumorstadien noch im Vergleich zu Normalpersonen feststellen.

Ähnliche Ergebnisse wie beim Blasenkarzinom fanden wir auch beim Nierenkarzinom (Tab. 16): Mit autologen Seren wurde ein hoher Prozentsatz positiver Zellen markiert. Nieren-Ca-Patienten haben also ebenfalls IgG-Antikörper gegen ihren Tumor im autologen Serum. Auch hier gibt es Kreuzreaktionen mit Seren allogener Nieren-Ca-Patienten, d.h. auch die IgG-Anti-Nierenkarzinom-Antikörper sind gruppenspezifisch. Eine Ähnlichkeit mit den Verhältnissen beim Blasenkarzinom bestand auch im Anstieg der Antikörpermenge mit dem Tumorstadium, den wir im autologen Serum der Nieren-Ca-Patienten beobachteten.

Ein deutlicher Unterschied bestand zwischen der Antikörpermenge im autologen Serum und in Seren allogener Nieren-Ca-Patienten auf der einen Seite und der Antikörpermenge in den Seren von Normalpersonen und Blasen-Ca-Patienten auf der anderen Seite. Bei letzteren fanden wir 8-13 % positiver Zellen, die wir, ähnlich wie beim Blasenkarzinom, als grenzwertig schwach positiv einordnen.

Bei Patienten mit Nierenkarzinom fiel noch auf: In Gruppe I fanden wir vier Patienten, bei denen schon in der Kochsalzkontrolle ein hoher Prozentsatz positiver Zellen gefunden wurde. Sie wurden deshalb in der Tabelle extra in einer Zeile zusammengefaßt. Diese Zellen mußten schon vor dem Test in vivo IgG-Antikörper gebunden haben, die dann mit dem FITC-konjugierten Antihuman-IgG reagieren konnten. Denn, zieht man den

Kochsalz-"Leerwert" dann vom Ergebnis der Seren ab, so bekommt man ziemlich genau ein Ergebnis, das dem der anderen Patienten der Gruppe I entspricht (s. Tab. 16). Wir konnten bei diesen vier Patienten keine weiteren auffallenden klinischen Befunde oder Gemeinsamkeiten entdecken, so daß wir die Deutung unseres Ergebnisses offen lassen müssen.

Antitumor-Antikörper vom Typ IgM konnten wir weder beim Blasen- noch beim Nierenkarzinom finden. Der Prozentsatz positiver Zellen blieb bei allen Seren unter sechs Prozent, also eindeutig im negativen Bereich (Tab. 17 und 18).

Antitumor-Antikörper vom IgA-Typ, die wir im autologen Serum von zwei Nieren-Ca-Patienten nachzuweisen versuchten, waren nicht vorhanden.

In den letzten Jahren wurden Antikörper gegen viele Tumorarten im Serum, sowie auch im Tumor selbst und in den regionalen Lymphknoten nachgewiesen, darunter auch gegen Blasen- und Nierenkarzinome (1,61,62,117).

Dabei wurde eine Vielzahl verschiedener Methoden verwendet:

- Immundiffusion
- Immunelektrophorese
- Zytotoxizitätstests
- Hemmung von Wachstum oder Kolonienbildung von Tumorzellen durch Serum elektronenmikroskopische Techniken mit Ferritin-gekoppeltem Anti-IgG

- Immunfluoreszenz
- ADCC (antibody dependent cell. cytotoxicity)
- ELISA (enzyme linked immunsorbent assay)

An der Existenz von Antitumor-Antikörpern besteht somit kein Zweifel mehr. Umstritten dagegen ist nach wie vor die Frage nach deren Spezifität. Weiterhin besteht Unklarheit über das Auftreten der Antikörper in der verschiedenen Phasen der Krebserkrankung, sowie der Beurteilung über in vivo Wirksamkeit.

a) zunächst zum Problem der Spezifität:

Ackermann (1) fand mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz Antitumor-Antikörper im Serum von Nieren-Ca-Patienten, beobachtete jedoch auch positive Reaktionen in Seren von Patienten mit einem anderen Tumor. Umgekehrt reagierte das Serum von Nieren-Ca-Patienten auch mit anderen Karzinomgeweben positiv.

Im Serum von Normalpersonen konnte er keine Antikörper gegen Tumoren nachweisen. Diese beschriebenen Antitumor-Antikörper wären also nach dieser Definition tumorassoziiert, nicht tumorspezifisch zu nennen.

Poulconer (38) entdeckte ein tumorassoziiertes Antigen beim Nieren-Ca und versuchte es zu isolieren. Birkmayer (13) fand identische tumorassoziierte Membrankomponenten bei

Melanomen, Gliomen und Nierenkarzinomen.

Hakala (61) und auch Dekernion (30) wiesen eine humorale Reaktivität gegen Nierenzellkarzinome nach, die zwar nach Absorption des Serums mit normalen Nierenzellen erhalten blieb, aber nach Absorption mit dem autologen Tumor verschwand. Da sie keine Absorptionsstudien mit allogenen Nierenkarzinomen durchführten, konnten sie keine Aussagen über die Gruppenspezifität treffen.

Die Spezifität der im Serum von Nieren-Ca-Patienten auftretenden Antitumor-Antikörper ist also bislang nicht zweifelsfrei geklärt.

Auch durch die Bestimmung zellvermittelter Zytotoxizität konnten bisher keine Beweise für spezifisch durch Nierenkarzinom induzierte immunologische Abwehrreaktionen erbracht werden: Während einige Autoren zunächst glaubten, Hinweise in diese Richtung gefunden zu haben (12,35,66), konnte das in späteren Untersuchungen nicht bestätigt werden (22).

Ueda (146) ordnete die mit dem Nierenzellkarzinom assoziierten Antigene in drei Kategorien ein:

1. individualspezifische
2. Nierenkarzinom-spezifische
3. kreuzreagierende Antigene

Die von uns nachgewiesenen Antikörper gegen Nierenkarzinom sind zum größten Teil tumorspezifischer Art (Kategorie 2). Im autologen Serum fand sich keine höhere Antikörpermenge als in den allogenen Nieren-Ca-Patienten-Seren, es waren also keine zusätzlichen individualspezifischen Antikörper nachweisbar (Kategorie 1). Die schwach positive Reaktion im Serum von gesunden Personen oder von Patienten mit Blasen-Ca wäre hingegen in die 3. Kategorie einzuordnen.

Phillip und Lewis (117) fanden bei 80 % der von ihnen untersuchten Blasenkarzinom-Patienten im Serum mit den Methoden der Immunfluoreszenz und das ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) tumorspezifische Antikörper, die weder mit normalem Blasengewebe noch mit Prostatakarcinom- und Melanomzellen reagierten. Auch Hakala (62) wies spezifisches Antitumor-Antikörper bei Blasen-Ca-Patienten nach, die die in vitro-Zytotoxizität der Lymphozyten sowohl von Tumorpatienten als auch von gesunden Personen gegenüber humanen Urothelkarzinomzellen im Sinne einer antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) beträchtlich erhöhten. Diese Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse unserer Arbeit, in denen eine spezifische humorale Immunantwort gegen das Blasenkarzinom gefunden wurde.

Obwohl die zelluläre Zytotoxizität gegen das Blasenkarzinom in den letzten Jahren ausführlich untersucht wurde, ist es bis jetzt umstritten, ob auch eine tumorspezifische zelluläre

Immunantwort gegen das Blasenkarzinom existiert: Während einige Untersucher meinen, eine solche nachgewiesen zu haben (11,23,72,112), sehen andere noch keinen überzeugenden Beweis einer tumorspezifischen Zytotoxizität erbracht (137).

Ähnliche Verhältnisse wie beim Blasen-Ca fanden Phillips und Lewis auch beim Prostatakarzinom, nämlich daß bei ca. 80 % der Patienten tumorspezifische Antikörper, Kreuzreaktionen mit Blasen-Ca-Gewebe nicht nachweisbar waren. Eine geringe Kreuzreaktion gab es hingegen zwischen Seren von Prostata-Ca-Patienten und Gewebe von benigner Prostatahyperplasie und umgekehrt zwischen Prostata-Ca-Gewebe und Serum von Patienten mit Hyperplasie (117).

Lewis und Mitarbeiter (98) wiesen bei Melanompatienten in der Membranimmunfluoreszenz individualspezifische Antitumor-Antikörper nach, in der zytoplasmatischen Immunfluoreszenz hingegen gruppenspezifische.

In einer späteren Arbeit konnten sie jedoch neben diesen individualspezifischen, gegen die Zellmembran gerichteten Antikörper, die nur durch autologe Tumorzellen zu absorbieren waren, auch gruppenspezifische nachweisen, die durch allogene Melanomtumorzellen absorbiert werden konnten (99).

Auch im Serum von Patienten mit Plattenepithelkarzinom wurden tumorspezifische Antikörper beobachtet (133), ebenso beim Burkitt-Lymphom (50,57), beim Osteosarkom, beim Colon-Ca (104) und beim Bronchial-Ca (134,154).

Im Gegensatz zu den anderen Tumoren, bei denen die Antikörper der IgG-Klasse zugeteilt wurden, ordneten Sofen und O'Toole die gegen das Plattenepithelkarzinom gerichteten Antikörper der IgM-Klasse zu.

Die in der Beurteilung der Spezifität unterschiedlichen Ergebnisse dürften ihre Erklärung nicht nur in den verschiedenen Antikörper-Nachweismethoden und den dabei verwendeten verschiedenen Aufbereitungsformen des Tumorantigens (lebende Zellen, Gefrierschnitte, Tumorextrakte, etablierte Zelllinien) finden, sondern auch durch das gleichzeitige Auftreten verschiedener Antigene auf den Tumorzellen: neuauftretene viral oder chemisch induzierte Tumorantigene, wiederauftretende onkofötale Antigene neben physiologischen ABO und HLA-Antigenen. Der Nachweis identischer tumorspezifischer Antikörper gegen Malignome wird von vielen Autoren als indirekter Beweis einer viralen Genese angesehen (13,16,150). Jedoch gibt es auch Anhaltspunkte dafür, daß chemisch induzierte Tumoren, zu denen man auch das Blasen-Ca rechnen darf, neben einem hohen Maß individualspezifischer Antigene auch gruppenspezifische aufweisen (107). Unsere Befunde deuten ebenfalls in diese Richtung.

b) zum Problem der in vivo Wirksamkeit von Antitumor-Antikörpern:

Die Hauptaufgabe von Antikörpern bei der Eindämmung des Tumorstwachstums besteht in der Elimination von Karzinomzellen. Dies wird in Zusammenarbeit mit dem Komplementsystem oder mit Lymphozyten bewirkt. Einige Autoren sehen einen weiteren

Wirkungsmechanismus darin, mit zirkulierenden Tumorzellen zu reagieren, sie unfähig zu machen am Endothel adhärenz zu werden und somit die Metastasierung zu verhindern (151). In den meisten Fällen kommt es jedoch trotz der Anwesenheit von Antikörpern zum weiteren Fortschreiten der Erkrankung. Antikörpern oder Antikörperfragmenten wurde dabei oft eine begünstigende Rolle als "blocking factors" zugewiesen (132).

Ab einer bestimmten Tumorgroße ist dann ganz einfach die Kapazität des Immunsystems überschritten. Einige Autoren berichten, daß der Antitumor-Antikörpertiter in den Stadien des lokalisierten Tumors am höchsten ist und daß der Titer abfällt, wenn der Tumor eine bestimmte Größe erreicht hat, während schließlich kurz vor dem Tod des Patienten oft gar keine Antitumor-Antikörper mehr nachweisbar sind (98). Dies konnten wir nicht nachvollziehen. Wir fanden auch bei Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien Antikörper in gleicher oder sogar etwas größerer Menge verglichen mit Patienten in den Anfangsstadien.

Es wurde schon in mehreren Fällen berichtet, daß nach Entfernung des Primärtumors auch bereits vorhandene Metastasen wieder verschwanden (76).

Durch die Verkleinerung der Tumormasse hat offenbar das Immunsystem wieder eine größere Chance, gegen die verbliebenen Karzinomzellen wirksam zu werden.

Die Rolle der Immunregulation durch Anti-Antikörper und Suppressorzellen bei der Beschränkung der in vivo Wirksamkeit der Antitumor-Antikörper wird weiter unten diskutiert.

Wir wollten ferner ein Phänomen überprüfen, über das einige Autoren in den letzten Jahren berichteten (19,40,88,101). Danach sollen Tumorzellen in der Lage sein IgG-Antikörper auf ihrer Zellmembran zu verändern und somit unwirksam zu machen. Es wird angenommen, daß Tumorzellen mit Hilfe lysosomaler, proteolytischer Enzyme den Fc-Teil von IgG-Molekülen an der "hinge"-Region abspalten können, in gleicher Weise, wie es experimentell durch Chymotrypsin bewirkt werden kann. Das resultierende $F(ab)_2$ -Fragment hat die Antigenität von intaktem IgG verloren, da die meisten Antigen-Determination auf dem Fc-Teil des Moleküls angesiedelt sind, außerdem existiert nach dem Verlust des Fc-Teils keine Bindungsstelle mehr für Komplement und Lymphozyten mit Fc-Rezeptoren. Durch die Spaltung werden aber bisher verborgene Antigen-Determinanten freigesetzt, die zur Bildung von anti- $F(ab)_2$ -Antikörpern führen können (102). Es gibt ein FITC-markiertes Antihuman- $F(ab)_2$ serum von der Ziege (Fa. Nordic), mit dem es möglich ist, die $F(ab)_2$ -Fragmente nachzuweisen.

Wir inkubierten also Tumorzellen mit verschiedenen Seren in gleicher Weise wie bei den oben beschriebenen Tests und versuchten dann mit Hilfe von FITC-markiertem Antihuman- $F(ab)_2$ -Serum nachzuweisen, ob die Tumorzelle Antikörpern aus den

Seren, die mit der Zellmembran reagiert hatten, an der "hinge"-Region das Fc-Ende abgespalten hat.

Auf Blasen-Ca-Zellen von Patienten der Gruppe I fanden wir nach Inkubation mit den verschiedenen Seren keine $F(ab)_2$ -Fragmente auf deren Oberfläche. Ganz anders war die Situation allerdings bei Blasen-Ca-Zellen von Patienten mit fortgeschrittenem Tumor: Hier konnten wir bei Inkubation mit autologem Serum und mit allogenen Blasen-Ca-Patienten-Seren $F(ab)_2$ auf der Zellmembran nachweisen. Ein Anstieg war noch zu verzeichnen von den Stadien II zu III.

Für uns bedeutet dies eine Bestätigung der These, daß Blasen-Ca-Zellen mit zunehmendem Grad der Entdifferenzierung in der Lage sind, von IgG-Antikörpern, die mit Membranantigenen reagiert haben, enzymatisch das Fc-Ende abzuspalten. Dieses Phänomen war noch nicht bei den hochdifferenzierten Zellen des Stadiums I (=TIS) nachzuweisen.

Mit Nieren-Ca-Zellen ließ sich das nicht in der gleichen Weise reproduzieren. Zunächst fiel einmal auf, daß die gleichen vier Patienten der Gruppe I, die schon im IgG-Nachweis einen hohen Prozentsatz positiver Zellen in der Kochsalzkontrolle aufwiesen, auch hier wieder einen ähnlichen hohen "Leerwert" hatten, so daß sie wieder gesondert erwähnt wurden.

Die hochdifferenzierten Zellen der Gruppe I wiesen ähnlich wie die Tumorzellen der Gruppe I bei den Blasen-Ca-Patienten praktisch keine $F(ab)_2$ -Fragmente auf ihrer Zellmembran auf. Anders als bei den Blasen-Ca-Zellen fanden wir jedoch auch bei Zellen von

Nieren-Ca-Patienten in fortgeschrittenen Stadien nur eine schwach positive Reaktion: Bei Inkubation mit autologem Serum und mit allogenen Nieren-Ca-Patienten-Seren fanden sich nur Prozentsätze $F(ab)_2$ -positiver Zellen von 10-18 %.

Eine Sonderrolle scheinen hier die vier Patienten mit hoher Kochsalzkontrolle zu spielen: Nach Abzug des "Kochsalz-Leerwerts" ist bei der Reaktion der Tumorzellen mit dem autologen Serum und den allogenen Nieren-Ca-Patienten-Seren ein hoher Prozentsatz $F(ab)_2$ tragender Zellen nachweisbar. Die Tumorzellen dieser vier Patienten scheinen also nicht nur schon in vivo IgG auf ihrer Oberfläche angelagert zu haben, sondern auch in der Lage zu sein, das Fc-Ende abzuspalten.

Bei den übrigen Nieren-Ca-Zellen, auch bei den entdifferenzier-ten, scheint der Mechanismus der enzymatischen Spaltung von IgG durch die Tumorzelle keine oder nur eine geringe Rolle zu spielen.

6.2. DISKUSSION DES TUMORZELL - NACHWEISES
=====

IN BLASENSPÜLUNGEN MITTELS IMMUN -
=====

FLUORESZENZ
=====

Nachdem nachgewiesen war, daß im Serum von Tumorpacienten IgG-Antikörper gegen ihren eigenen Tumor vorhanden sind, und daß diese Antikörper auch mit Tumorzellen anderer Pacienten mit histologisch gleichem Tumor reagieren, also gruppenspezifisch sind, sollte im nächsten Schritt versucht werden, mit Hilfe dieser Antikörper Tumorzellen in Blasenpülflüssigkeiten nachzuweisen. Hierzu wurde wieder die Technik der indirekten Membran-Immunfluoreszenz angewandt.

Das Ergebnis der Immunfluoreszenz wurde anschließend mit der Klinik, der Histologie und der zytologischen Untersuchung nach Papanikolaou (115) verglichen. Während uns von allen Tumorpacienten eine Histologie vorlag, konnten wir bei den Vergleichspacienten nur bei der Hälfte auf eine solche zurückgreifen, von der anderen Hälfte lag allerdings eine klinisch eindeutige Diagnose vor. Die Pacienten wurden nach Histologie und Klinik in die zwei Gruppen Tumorpacienten und Vergleichspersonen eingeteilt und das Ergebnis der Immunfluoreszenz und der zytologischen

Untersuchung nach Papanikolaou damit verglichen (Tab. 23). Bei allen 10 Tumorpatienten war auch die Immunfluoreszenz mit Zellen aus der Blasenspülung positiv. Das bedeutet, daß es gelang, mit Hilfe der spezifischen IgG-Antitumor-Antikörper, die wir im Serum von Blasenkarzinompatienten nachgewiesen hatten und die nicht mit normalen Urothelien reagiert hatten, in der Blasenspülung Tumorzellen und gutartige Zellen zu unterscheiden. Hingegen konnte der Zytologe in vier Fällen nur den Verdacht auf Tumorzellen äußern, bei sechs Patienten waren Tumorzellen sicher nachweisbar (s. Tab. 23).

Bei der Vergleichsgruppe mit nicht malignen Erkrankungen war in allen Fällen auch die Immunfluoreszenz negativ, während der Zytologe in zwei Fällen mit negativer Histologie den Verdacht auf Tumorzellen äußerte. Hier bestehen die zwei Möglichkeiten, daß entweder für die Histologie keine Tumoranteile erfaßt worden waren oder daß der Zytologe ein falsch positives Ergebnis ermittelte.

Die Zytologie nach Papanikolaou hat unter optimalen Bedingungen und bei einem erfahrenen Untersucher eine Trefferquote von ca. 85 % (82).

Bei Papillomen (histologischer Grad G0) und nichtinvasiven Urothelkarzinomen ist der Prozentsatz falsch negativer zytologischer Befunde mit 30-66 % besonders hoch (31,42). Johnson (82) untersuchte bei 163 Patienten mit histologisch gesichertem Blasenkarzinom die zytologischen Ergebnisse. In 64 % der Fälle war die Zytologie positiv, in 24 % verdächtig und in 12 % falsch negativ. Die Zahl falsch positiver Ergebnisse wird von den meisten

Autoren im Bereich von 5-15 % angegeben (31,42,153). Möglichkeiten für falsch positive und falsch negative Ergebnisse zeigt die Tab. 31: Wie man daraus entnehmen kann, gestaltet sich gerade die Zytologie in der Nachkontrolle von behandelten Blasentumoren schwierig. Regenerierendes Urothel nach transurethralen Eingriffen, durch Infekte, vorausgegangene Bestrahlungen und Chemotherapie veränderte Urothelien können mitunter nur sehr schlecht oder gar nicht von Tumorzellen zu unterscheiden sein, während sich auf der anderen Seite Zellen hochdifferenzierter, nicht infiltrierender Blasentumoren kaum noch von normalen Urothelien unterscheiden (42,82).

Hier bietet die Methode der Immunfluoreszenz Vorteile: Eine immunologische Entdifferenzierung, also die Veränderung der Antigenstruktur der Zellmembran, erfolgt schon wesentlich vor einer histomorphologischen Veränderung. Deshalb können durch die Immunfluoreszenz hochdifferenzierte Tumorzellen auf Grund ihrer Tumorantigene ebenso von normalen Zellen unterschieden werden, wie sich regenerierendes oder entzündlich verändertes Urothel als normal erkannt werden kann.

Gruber untersuchte mit derselben Methodik der Membranimmunfluoreszenz postoperative Abstriche von Patienten mit Tonsillenkarzinom und konnte schon 2-3 Monate vor dem klinischen Auftreten eines Rezidivs Tumorzellen nachweisen (55).

Tab. 31: MÖGLICHKEITEN FÜR EINEN FALSCH POSITIVEN UND EINEN
NEGATIVEN ZYTOLOGISCHEN BEFUND BEI UROTHELKARZINOMEN

I. Möglichkeiten für einen falsch positiven zytologischen Befund

1. Die Zytologie ist korrekt, der Tumor entzieht sich aber dem endoskopischen Nachweis.
2. Regenerierendes Urothel nach transurethralen Eingriffen.
3. Harnwegsinfekt
4. Vorausgegangene Blasenbestrahlung oder Chemotherapie
5. Urolithiasis
6. Benigne Prostatahyperplasie

II. Möglichkeiten für einen falsch negativen zytologischen Befund

1. Unzureichende Zellzahl
2. Zellen von hochdifferenzierten, nicht infiltrierenden Blasen-
tumoren
3. Der Tumor ist an der Oberfläche nekrotisch
4. Durch Erythrozyten und Leukozyten wird der exfoliative Zell-
hintergrund überlagert.
5. Zu spät oder schlecht verarbeitete Präparate
6. Unzureichendes Übertragen des Filtrates auf den Objektträger

(nach Altwein, 5)

Die Immunfluoreszenz stellt auch nach unserer Meinung eine Methode dar, die die diagnostischen Möglichkeiten bei der Suche nach Blasenkarzinomen und bei der Nachkontrolle nach Therapie erweitern und verbessern könnte. Wir schlagen vor, einen Teil des für die zytologische Untersuchung nach Papanikolaou bestimmten Materials zur Immunfluoreszenz zu verwenden. Neben dem geringen Aufwand ist vor allem die Tatsache ein Vorteil, daß die Immunfluoreszenz-Methode kombiniert mit der Zytologie angesichts der häufig notwendigen Kontrolluntersuchungen nach Primärtherapie des Tumors keinerlei Belastung für den Patienten mit sich bringt. Auch bei einem Patienten mit Nierenkarzinom, das schon in das Nierenbecken eingebrochen war, konnten wir Tumorzellen in der Blasenspülung nachweisen.

Interessant war der Befund eines Patienten, bei dem histologisch eine Zystitis glandularis mit von Brunnscher Zellnestern gefunden worden war. Hierbei handelt es sich um eine Metaplasie der Blasenschleimhaut, die als Vorstufe des Adeno-Karzinoms aufgefaßt wird (5). Hier war nur die Immunfluoreszenz mit dem autologen Serum positiv, während das Serum eines Patienten mit Urothelkarzinom ebenso negativ blieb wie das Serum einer Normalperson. Daraus ist erkenntlich, daß keine Antigengemeinschaft zwischen einem Urothel-Ca und der metaplastischen Vorstufe eines Adeno-Ca vorliegt.

6.3. DISKUSSION: GESAMTLYMPHOZYTEN/ T- UND =====

B- L Y M P H O Z Y T E N V E R T E I L U N G =====

Wir untersuchten bei Blasen- und Nierenkarzinompatienten die Gesamtlymphozytenzahl, sowie den Anteil der T- und B-Lymphozyten.

Als Normalbereich wird von den meisten Autoren eine Gesamtlymphozytenzahl zwischen 1000-4000/ul angegeben. Asma und Mitarbeiter (8) fanden als Mittelwert bei gesunden Personen 2244/ul, Jonsson gab 1732/ul an (84). Damit verglichen bewegte sich die Gesamtlymphozytenzahl bei den von uns untersuchten Tumorpatienten meist im unteren Normbereich. Deutlich erniedrigt war die Zahl bei Patienten mit fortgeschrittenem Nierenkarzinom. Amin und Lich fanden 1974 bei Blasen-Ca-Patienten, daß mit der Tumorprogression auch die Zahl der peripheren Lymphozyten absinkt und daß eine erniedrigte Gesamtlymphozytenzahl in einem früheren Stadium ein prognostisch ungünstiges Zeichen darstellt (6). Franks und Williams (43) stellten bei Patienten mit Bronchial-Ca sowohl eine Lymphopenie als auch eine Monozytopenie fest und wiesen diesen Werten prognostische Bedeutung zu. Der Befund erniedrigter Gesamtlymphozyten, wie wir sie zwar weniger beim Blasenkarzinom, dafür aber signifikant beim Nierenkarzinom nachweisen konnten, ist wohl mitverantwortlich für die herabgesetzte Immunantwort in hohen Tumorstadien.

Der prozentuale T-Lymphozytenanteil ist sowohl bei Blasen- als auch bei Nierenkarzinompatienten in allen Stadien gleichermaßen verringert (52-53 %). Mit derselben Methodik fanden Asma und Mitarbeiter (8) bei gesunden Personen durchschnittlich 76 %, Jonsson 61 % T-Lymphozyten, bei einer eigenen Kontrollgruppe ermittelten wir einen T-Zell-Anteil von 67 %.

Jonsson (84) und Bach (9) stellten fest, daß bei den T-Lymphozytenbestimmung mit der Rosettenmethode schon kleine Variationen im analytischen Prozess das Ergebnis erheblich beeinflussen können. Einmal gebildete Rosetten sind sehr empfindlich und lösen sich leicht wieder auf. Dies dürfte auch der Grund dafür sein, daß die Werte der Rosettenmethode konstant etwas niedriger liegen als die mit der Fluoreszenz ermittelten T-Lymphozytenanteile.

Die in allen Stadien erniedrigten T-Zell-Anteile lassen zusammen mit den im unteren Normbereich liegenden Gesamtlymphozytenzahlen auch eine erniedrigte absolute T-Zell-Anzahl errechnen. Auch Wybran (155) und Hersh (74) fanden bei Ca-Patienten, v.a. in fortgeschrittenen Stadien, erniedrigte T-Lymphozytenanteile und Brosman (21) stellte eine größere Variabilität der T-Zellzahl nach oben und nach unten fest.

Die reduzierten Gesamtlymphozyten und der erniedrigte T-Zellanteil sind wohl zusammen mit suppressiven Mechanismen für herabgesetzte Immunreaktionen in fortgeschrittenen Tumorstadien verantwortlich. Mehrere Untersucher beobachteten bei solchen Patienten im Hauttest vom verzögerten Typ mit DNCB und anderen Stoffen eine

herabgesetzte T-Zell-Reaktivität (21,25,56,108).

Der B-Lymphozytenanteil bewegte sich bei Blasen- und Nieren-Ca-Patienten in allen Stadien durchwegs im mittleren Normbereich. Mit diesem konstanten B-Zellanteil ist die von uns gemachte Beobachtung gut vereinbar, nämlich daß auch bei Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien Antikörper sogar in leicht erhöhter Menge nachweisbar sind. Dabei bleibt die in vivo Funktion dieser Antikörper noch zu klären.

Zählt man den B- und den T-Lymphozytenanteil zusammen und subtrahiert man diese Zahl von 100 %, so bleibt ein Rest von Lymphozyten, die sich mit unseren Methoden weder den B- noch den T-Zellen zuordnen lassen, die sogenannten Null-Lymphozyten. Ihr Anteil beträgt bei Asma und bei Jonsson bei gesunden Personen ungefähr 10 %, in unserer Kontrollgruppe 16 %, bei den Karzinompatienten zwischen 20-30 %. Für diese Zellen sind mehrere Möglichkeiten denkbar: Sie sind wegen der Insuffizienz der derzeitigen Techniken nicht zuzuordnen, oder es handelt sich um unreife, noch undifferenzierte B- bzw. T-Lymphozyten-Vorläufer, bzw. Makrophagen oder weitere Lymphozytenpopulationen. Zu letzteren gehören auch Lymphozyten mit Fc-Rezeptoren, die in Kooperation mit Antikörpern zytotoxisch wirken ("ADCC = Antibody-dependent-cellular-Cytotoxicity") oder die natürlichen Killerzellen.

6.4. DISKUSSION: SUPPRESSOR-ZELL-AKTIVITÄT BEI BLASEN- UND NIEREN-CA- =====

PATIENTEN SOWIE BEI VERGLEICHSGRUPPEN =====

6.4. 1. Konzept der Immunregulation

Auf das Stadium der zellulären Immunität von Karzinompatienten wurde bisher das größte Augenmerk in der Tumorummunologie gerichtet. Hier ist es wiederum die Untersuchung der Zytotoxizität von immunkompetenten Zellen, die am meisten Beachtung fand. Wir wollten auf dem Gebiet der zellulären Immunität, wie schon in der Einleitung ausgeführt, einen Beitrag leisten zum Problem der Immunregulation durch Zellen und zum Problem der Immunsuppression im Verlauf der Krebserkrankung.

Soweit bisher experimentell bewiesen werden konnte, wird die Regulation des Immunsystems durch mehrere, teilweise ineinandergreifende Mechanismen bewirkt. McDevitt wies eine genetische Steuerung nach (106). Er fand, daß die Reaktion auf einen antigenen Reiz von autosomal dominanten Genen korreliert wird, die an 8- 10 Loci sitzen und eng mit den Histokompatibilitätsgenen assoziiert sind. Auf welche Weise die Expression erfolgt, ist noch weitgehend ungeklärt.

Das das Immunsystem auch durch nervale und hormonelle Reize, beispielsweise durch Corticosteroide beeinflusst wird, steht außer Zweifel. Diese äußerst komplexen Zusammenhänge sind derzeit erst in Anfängen erforscht.

Weiterhin erfolgt eine Regulation des Immunsystems durch stimulierend oder supprimierend wirkende zelluläre und humorale Bestandteile des Immunsystems selbst.

Das Konzept der Immunregulation durch immunsuppressive Mechanismen beruht auf Befunden, daß das Immunsystem vermutlich nur für eine Antigenstimulation von bestimmter Dauer ausgerichtet ist. Nach einer gewissen Zeit tritt eine Regulation im Sinne eines negativen feed back auf, damit die Immunantwort nach der Elimination des Antigens, etwa eines Mikroorganismus, wieder gedämpft wird.

Einer der dafür in Frage kommenden Mechanismen ist, ähnlich dem Rückkopplungsmechanismus enzymatischer Reaktionen, die Unterdrückung der Synthese weiterer Antikörper ab einer bestimmten Serumkonzentration.

Andererseits wurde entdeckt, daß Immunglobuline selbst zu Antigenen werden können, indem sie durch proteolytische Abspaltungen oder Reaktion mit Fremdproteinen so in ihrer Struktur verändert werden, daß sie körperfremd erscheinen. So wurde beispielsweise in Situationen mit wiederholter oder andauernder Antigenstimulation das Auftreten von Anti-Antikörpern beobachtet. Sie sind gegen verschiedene Antigen determinanten von menschlichen Immunglobulinen gerichtet. Anti-Idiotypen werden Antikörper gegen die Antigenbindungsstellen von IgG genannt, daneben werden bei Autoimmun- und Rheumaerkrankungen Antikörper gegen den Fc-Teil von IgG beobachtet (Rheumafaktoren!). Antikörper gegen den

F(ab)₂ Teil von IgG wurden bei chronischen grampositiven Infektionen nachgewiesen (26,113,121,149).

Gupta (58) wies bei Blasen-Ca-Patienten Rheumafaktoren nach. Deren Konzentration stieg kontinuierlich von Stadium I, wo der Nachweis, wenn überhaupt, nur in unverdünnten Seren gelang, bis zum Stadium IV an, in dem er Titer bis 1:80 nachweisen konnte.

Neben diesen Anti-Antikörpern kommt eine entscheidende Rolle bei der Immunregulation lymphoiden Zellen zu, die imstande sind, die Aktivität sowohl von T- als auch von B-Zellen zu supprimieren (48,77,80,128,130,141,148).

Ein gegenteiliger Effekt wird den sogenannten Helferzellen zugeschrieben, nämlich die T- und B-Zellfunktionen zu potenzieren. Helfer- und Suppressorzellen werden als entscheidende Mechanismen der Immunregulation betrachtet (129) und verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen zugerechnet.

Moretta u.a. (109) versuchten spezifische Zelloberflächenstrukturen bei Helfer- und Suppressorzellen zu analysieren.

Diese Zellen sollen schon als unreife und inaktive Pro-Helfer bzw. Pro-Suppressorzellen im peripheren Blut vorhanden sein. Durch verschiedene Interaktionen mit anderen Lymphozyten sowie Makrophagen reifen sie zu voller Funktionsfähigkeit heran.

Die Existenz solcher Suppressorzellen im peripheren Blut von gesunden, normalen Personen wird postuliert. Shou und Mitarbeiter (128) fanden, daß diese Zellen durch in vitro Inkubation

mit ConA aktiviert werden können. Sie definierten Suppression als reversible Hemmung der Lymphozyten-Blastogenese, die keine Zeichen von Zytotoxizität aufweist und nicht mit dem Zelltod endet.

Der molekulare Mechanismus der Immunregulation durch Suppression ist noch nicht eindeutig geklärt. Ein direkter Zell zu Zell-Kontakt scheint nicht nötig zu sein, die meisten Befunde deuten darauf hin, daß beim Menschen, wie auch schon im Tierversuch demonstriert (120,142), lösliche Mediatoren beteiligt sind, inwieweit verschiedene Membranrezeptoren eine Rolle spielen, steht noch offen.

Jadden (60) fand Anhaltspunkte dafür, daß humane Helfer- und Suppressorzellen die Funktion von T- und B-Zellen über die Sekretion von Makromolekülen beeinflussen. Taussig (140) beschreibt als wichtigste Eigenschaft dieser von Suppressorzellen sezernierten Faktoren die Fähigkeit, spezifisch mit dem Antigen, gegen das sie gebildet wurden, zu reagieren, während sie jedoch die meisten Charakteristika von Antikörpern vermissen lassen. Goodwin und Mitarbeiter (51,52) schrieben die Hemmung der humanen T-Zell-Mitogenese dem Einfluß von Prostaglandin zu, das von Suppressorzellen gebildet wird. Bei Zugabe von Indomethacin stieg die T-Zell-Mitogenese wieder deutlich an, was die Autoren mit der Blockade der Prostaglandin-Synthetase durch Indomethacin erklärten.

Die meisten Autoren rechnen die Suppressorzellen den T-Lymphozyten zu (19,73). Hammer (63) stellte eine gesteigerte Suppressor-

Zell-Aktivität in T-Lymphozyten-Anreicherungen fest, eine verminderte hingegen bei B-Zellanreicherungen und bei der Wegnahme von Makrophagen. Aber auch B-Lymphozyten (86,87,158) und Makrophagen (91,96,111) werden suppressive Regulatorfunktionen zugeschrieben. Es wird angenommen, daß in bestimmten Fällen erst durch die Zusammenarbeit verschiedener Zelltypen, v.a. von T-Zellen und Makrophagen, eine suppressive Aktivität erreicht wird.

Die physiologische Aufgabe der Suppressorzellen, die Immunreaktion nach einer Antigenexposition wieder zu dämpfen, stellt wahrscheinlich auch einen Sicherungsmechanismus gegen Autoimmunreaktionen dar. Nicht nur tierexperimentell ist nachgewiesen, daß eine herabgesetzte Suppressor-T-Zell-Funktion zu einer Autoimmunerkrankung führen kann (3,135,138), auch beim Menschen wurde dies im Falle des systematischen Lupus erythematodes, der juvenilen Polyarthrits, bei Patienten mit M. Chron und Colitis ulzerosa (46) und bei Patienten mit Myasthenia gravis (124) bestätigt. Die reduzierte Suppressor-Zell-Aktivität fand sich hierbei vor allem in den aktiven Stadien der Erkrankung.

Zilko fand bei Myasthenia Gravis-Patienten eine Korrelation zwischen reduzierter Suppressor-Zell-Aktivität und den HLA-Antigenen HLA-B8 und DRW 3 und schloß auf eine genetische Kontrolle der Suppressor-Lymphozyten-Funktion. Er schrieb allerdings diesen Suppressorzellen nicht die entscheidende Rolle in der Pathogenese der Erkrankung zu, da er keinen Zusammenhang nachweisen konnte zwischen der reduzierten Suppressor-Zell-Aktivität

und der Aktivität der Erkrankung (160).

Auf der anderen Seite stellten Gorski und Mitarbeiter bei Patienten mit Aplastischer Anämie gesteigerte Suppressor-Zell-Aktivität fest, die die Hämatopoese unterdrückte. Mit Hilfe von Prednisolon gelang es ihnen, diese Suppressor-Zell-Aktivität zu unterdrücken und die Hämatopoese zu normalisieren (53).

Die suppressiven Regulationsfunktionen sind teils antigenspezifisch, teils unspezifischer Art. Es wird angenommen, daß die unspezifische Suppression v.a. von nicht-T-Zellen bewirkt wird.

Wir richteten unser Augenmerk nun auf die Rolle der Suppressorzellen im Verlauf von Tumorerkrankungen. Hier würde ja die Eindämmung der Immunantwort durch suppressiv wirkende Zellen nach einer gewissen Zeit der Auseinandersetzung mit dem Tumorantigen einen unerwünschten, für den Patienten äußerst deletären Regulationsmechanismus darstellen.

Immunsuppressive Mechanismen werden angeschuldigt, in vielen Phasen des Tumorstadiums eine bedeutende Rolle zu spielen: Bei der Tumorentstehung als Ursache für den Fehler in der "Immunsurveillance", beim sich entwickelnden Tumor in der Beeinträchtigung der spezifischen Immunantwort und schließlich bei fortgeschrittenen Tumoren als verantwortlich für eine unspezifische generelle Suppression des Immunsystems.

Thomas (142) sieht in antimitotisch wirkenden Suppressorzellen eine der Arten der "Immunsurveillance", die dafür verantwortlich ist, Zellen, die ständig maligne entarten, an der Proliferation

zu hindern. Ein Fehler in der Funktion dieser Suppressorzellen würde also die Tumorentstehung begünstigen.

Weiterhin werden Suppressorzellen angeschuldigt, neben der spezifischen Begrenzung der Immunantwort auf den Tumor auch unspezifisch eine generelle Suppression des Immunsystems in fortgeschrittenen Stadien zu verursachen. Dies findet seinen Ausdruck in herabgesetzten Reaktionen bei Hauttesten vom verzögerten Typ, in verminderter Stimulierbarkeit bei Lymphozyten-Transformationstesten und in verminderten in-vitro-Zytotoxizitätsreaktionen (21,25,56,108).

Wir untersuchten nun die Suppressor-Zell-Aktivität von Lymphozyten im peripheren Blut von Blasen- und Nieren-Ca-Patienten, um nähere Aussagen über die Mechanismen der Immunregulation im Verlauf von Tumorerkrankungen treffen zu können.

6.4.2. Methodik

Hunninghake und Fauci haben folgende Eigenschaften des in vitro Verhaltens von Suppressorzellen beschrieben (77):

"In vitro-Stimulation humaner peripherer Lymphozyten durch ConA resultiert bei manchen Individuen vorzüglich in einer Stimulierung von zytotoxischen Zellen, die in der Lage sind, allogene Target-Zellen zu töten, oder resultiert in der Aktivierung von Suppressorzellen, die ihrerseits die Entstehung allogener zytotoxischer Zellen verhindert. Die Versuche zeigen, daß ConA aktivierte Lymphozyten von "High-respondern", d.h. Individuen mit

ausgeprägter Zytotoxizität, nicht in der Lage sind, die Generation zytotoxischer Zellen anderer high-responder zu unterdrücken. Dagegen können ConA-aktivierte Zellen von low-respondern regelmäßig die Entstehung von zytotoxischen Zellen von high-respondern supprimieren. Da ConA aktivierte Zellen solcher low-responder selbst unter Zugabe von Helfer-Zellen von high-respondern nicht in der Lage sind, allogene Targetzellen zu zerstören, muß ein Mangel an Helfer-Zellen für diese Funktion ausgeschlossen werden. Es besteht eher ein Hinweis dafür, daß tatsächlich Suppressorzellfunktionen bestimmter Lymphozytenpopulationen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort auch bei normalen Individuen spielen. Diese suppressive Wirkung tritt nur während der Generation von zytotoxischen Zellen auf, kann also die Funktion der "Killerzellen" nicht mehr direkt beeinflussen. Inkubation mit Mitomycin C reduziert diese Aktivität, was vermuten läßt, daß eine Proliferation für die Generation von Suppressorzellen unumgänglich ist."

Wir stellten in eigenen Vorversuchen fest, daß eine Inkubationszeit von 48-72 h optimal für die Generation von Suppressorzellen ist (auch 128). Wir arbeiteten ferner mit zwei auf verschiedene Weise generierten Arten von Suppressorzellen:

a) wir versuchten durch ConA-Zugabe die Proliferation von Suppressorzellen zu erhöhen. Diese Gruppe wurde "aktivierte Suppressorzellen" genannt (ASZ).

b) wir inkubierten Lymphozyten ohne Zusatz von ConA, diese wurden als "spontane Suppressorzellen" bezeichnet (SSZ). Das hier verwendete Testsystem basiert auf dem Test von Shou, Schwartz und Good (128), modifiziert von Hammer, Jerry und Lewis (63).

Wir, wie auch andere Autoren (64) verglichen das Ergebnis von Targetzellen, die durch Suppressorzellen beeinflusst wurden, mit Targetzellen, die nur mit Kontrolllymphozyten gemischt wurden. Unter "Suppressorzellen" verstehen wir dabei Lymphozyten, die entweder mit ConA (ASZ) oder ohne ConA (SSZ) 48 h inkubiert und dann bestrahlt wurden. Unter Kontrolllymphozyten verstehen wir die Zellen vom gleichen Individuum wie die Targetzellen ohne Vorinkubation, aber ebenfalls bestrahlt (s. Kap. Methodik S. 39, Berechnung der Suppressor-Zell-Aktivität). Suppressorzellen wie auch Kontrolllymphozyten wurden also bestrahlt, um wirklich nur die Proliferation der Targetzellen zu erfassen. Wir stellten in Vorversuchen fest, daß die Zellen nach einer Dosis von 2000 rad keine proliferative Tätigkeit, in unserem Test als DNS-Neusynthese gemessen, mehr zeigen, aber weiterhin suppressive Funktionen entfalten können. Andere Untersucher bestrahlten mit 1000 rad (Chiu, 27 Engleman, 37) oder sogar mit 6000 rad (Han, 64). Wieder andere versuchten dieses Ziel mit Mitomycin zu erreichen (46,128).

Wir untersuchten die Suppressor-Zell-Aktivität in 4 verschiedenen Testansätzen: Das Prinzip ist bei allen das gleiche, sie unterscheiden sich nur in der Art der Stimulation der Targetzellen-Proliferation: Zum einen wurden hierzu die 3 Mitogene ConA, Phytohämagglutinin und Pokeweed-Mitogen verwendet, zum anderen allogene, bestrahlte Lymphozyten als stimulierendes Alloantigen in der MLC.

Bei der Bestimmung der Suppressor-Zell-Aktivität ergaben sich in fast allen Gruppen relativ große Standardabweichungen, die sich bei Tests mit lebenden Zellen, die sich über mehrere Tage erstrecken, wohl schwerlich vermeiden lassen.

Die in vivo-Relevanz des hier verwendeten Suppressor-Zell-Tests kann ebenso wie die der Zytotoxizitäts- und anderer ähnlicher in vitro-Teste nicht eindeutig beurteilt werden.

6.4.3. Diskussion der Ergebnisse

Unsere Fragestellungen waren:

- Gibt es Unterschiede in der Suppressor-Zell-Aktivität der Lymphozyten im peripheren Blut zwischen Normalpersonen und Zystitispatienten auf der einen und Tumorpatienten auf der anderen Seite?
- Unterscheiden sich Tumorpatienten in Anfangsstadien von Patienten mit fortgeschrittenem Karzinom?

a) Gemischte Lymphozyten Kultur (MLC)

Bei Normalpersonen fanden wir keine Suppressor-Zell-Aktivität. Bei diesem als tumor- und infektionsfrei definierten Personenkreis nehmen wir ein Gleichgewicht von Helfer- und Suppressorzellen an, da es weder zu einer Stimulation noch zu einer Suppression der Targetzellen kommt.

Auch die Lymphozyten von Zystitis-Patienten wirken nicht suppressierend. Sowohl als SSZ als auch als ASZ führten sie sogar zu einer Stimulation der Target-Lymphozyten-Proliferation. Wir führen diesen Befund auf vermehrte Aktivität von Helfer-Lymphozyten zurück.

Wie sah es nun bei den Tumorpatienten aus? Blasen-Ca-Patienten der Gruppe A, also Patienten in niederen Tumorstadien, wiesen leicht positive Werte auf, d.h. genau wie bei Normalpersonen war keine Suppressor-Aktivität nachweisbar.

Bei Blasen-Ca-Patienten der Gruppe B, Patienten im fortgeschrittenem Stadium, änderte sich die Lage deutlich: Beide Arten von Lymphozyten, die SSZ und die ASZ, zeigten eine ausgeprägte Suppressor-Zell-Aktivität, die sich signifikant von den Lymphozyten der Blasen-Ca-Patienten Gruppe A unterschied. Eine Suppressor-Zell-Aktivität in der Gemischten Lymphozyten Kultur ist folglich erst bei Blasen-Ca-Patienten mit fortgeschrittener lokaler Tumorgroße oder mit Metastasierung nachweisbar.

Bei den Nieren-Ca-Patienten wurden ähnliche Resultate gefunden. Bei Patienten der Stadien I ergab sich eine Diskrepanz zwischen SSZ und ASZ. Während die SSZ genauso wie die der Blasen-Ca-Patienten keine Suppression erkennen ließen und damit im Bereich der Ergebnisse der Normalpersonen lagen, wurde durch ASZ eine deutliche Suppression erzielt. Aber auch bei den Nieren-Ca-Patienten konnte ein Überwiegen der Suppressor-Zell-Aktivität über die Funktion der Helferzellen in den fortgeschrittenen Stadien II festgestellt werden.

Unsere Fragestellungen wurden in der Gemischten Lymphozyten Kultur folgendermaßen beantwortet: Tumorpatienten in den niederen Stadien (Blasen-Ca-Patienten Gruppe A, Nieren-Ca-Patienten Gruppe I) zeigen keine Suppressive Aktivität, mit Ausnahme der aktivierten Lymphozyten der Nieren-Ca-Patienten Gruppe I. Sie zeigen die gleichen Werte wie Normalpersonen. Erst bei Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung führt die chronische Antigen-Stimulation durch das Karzinom zu einer

Änderung der Immunregulation im Sinne einer Suppression. Bei Patienten mit Zystitis dagegen findet man eine ausgeprägte Stimulation.

b) PHA-Testansätze

Die Ergebnisse der Normalpersonen lagen hier im Bereich einer leichten Suppression. Praktisch identisch waren die Werte von Blasen-Ca-Patienten der Gruppe A. Bei den Nieren-Ca-Patienten in niederen Stadien (I) beobachteten wir eine geringfügige höhere Suppressor-Zell-Aktivität. Diese Übereinstimmung zwischen Normalpersonen mit Tumorpatienten in den Anfangsstadien konnten wir schon in der MLC nachweisen. Hier stieg ebenso die Suppressor-Zell-Aktivität bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien an, wobei sich ein erhöhter Suppressor-Zell-Tonus gleichermaßen bei Blasen- wie bei Nierenkarzinompatienten fand.

Auch im PHA-Test bewirkten Lymphozyten von Patienten mit Zystitis eine Stimulation der Targetzellen, allerdings nur die SSZ, während die ASZ eine leichte Suppressor-Zell-Aktivität zeigen, die den Werten der Normalpersonen entspricht. Der PHA-Test bestätigte mit geringen Abweichungen die Aussagen, die schon bei der Gemischten Lymphozyten Kultur getroffen wurden.

c) PWM-Testansätze

SSZ von Normalpersonen stimulieren allogene Target-Lymphozyten leicht, ASZ sehr ausgeprägt. Im Gegensatz zur MLC und zum PHA-Test besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den Normalpersonen

und den Tumorpacienten der niederen Stadien. Die Lymphocyten der Blasen-Ca-Pacienten Gruppe A wiesen eine leichte Suppression auf, vergleichbar mit der im PHA-Test. Die Lymphocyten der Nieren-Ca-Pacienten der Gruppe I hingegen supprimierten schon deutlicher, v.a. die ASZ. Bei den Pacienten in fortgeschrittenen Tumorstadien setzte sich die schon in den beiden beschriebenen Testen erwähnte Linie fort: Sowohl bei den Blasen- als auch bei den Nieren-Ca-Pacienten ist die Immunregulation in höheren Stadien deutlich zu Gunsten einer Suppression verschoben. Zu berücksichtigen sind bei den Nieren-Ca-Pacienten allerdings die geringen n-Zahlen, die keine sichere Beurteilung ermöglichen.

Aus dem Rahmen fällt im PWM-Test der Wert der Zystitis-Pacienten: Im Gegensatz zur MLC und zum PHA-Test und auch zum unten beschriebenen ConA-Testansatz fanden wir hier eine hohe Suppression. Wir müssen die Beurteilung dieses Befundes offenlassen, eine Erklärung könnte in der Tatsache liegen, daß es sich bei PWM um ein E-Zell-Stimulans mit einer von PHA und ConA differenten Wirkung handelt (120).

Die übrigen Resultate sind jedoch durchaus mit den anderen Testergebnissen vergleichbar.

d) ConA-Testansätze

Beim ConA-Test liegt der Normalbereich sowohl bei den SSZ als auch bei den ASZ deutlich im Bereich der Suppression. Dieser Befund ist bekannt und auch schon von Hammer (63) beschrieben.

Die Anfangsstadien der Blasenkarzinome (Gruppe A) zeigen eine noch höhere Suppression, die allerdings wie bei den schon beschriebenen Testen noch ansteigt mit der Ausbreitung des Tumors (Gruppe B). Nieren-Ca-Patienten in niederen Stadien liegen mit ihrer Suppressor-Zell-Aktivität etwas unter den Normalpersonen und wir beobachteten ebenfalls einen Anstieg bei Nieren-Ca-Patienten in höheren Stadien.

Zystitis-Patienten zeigten keine Suppressor-Zell-Aktivität, sondern stimulierten die Proliferation der Targetzellen, die SSZ sogar noch deutlicher als die ASZ.

6.4.4. Einordnung unserer Ergebnisse, Vergleich mit anderen Autoren.

Karzinompatienten in niederen Tumorstadien verhalten sich in der Regulation ihres Immunsystems weitgehend wie Normalpersonen, es ist noch keine Eindämmung der Immunantwort im Sinne eines negativen feed back durch lymphoide Zellen mit suppressiver Aktivität erfolgt. Bisher wurde noch keine Suppressor-Zell-Aktivität während der frühen Entwicklungsphase von Tumoren beschrieben. Als Beispiel für solche frühen Tumorstadien verweisen wir besonders auf die Ergebnisse der Blasen-Ca-Patienten Gruppe A, Tis-T2 No Mo, wo wir keinerlei Suppressor-Zell-Aktivität, die von Normalpersonen abweichen würde, feststellen konnten. Kirchner (93) sieht zur Zeit keinen Hinweis dafür, daß Suppressorzellen eine Rolle beim Versagen der Immunsurveillance spielen. Eine deutliche Verschiebung in Richtung auf eine Suppressor-Zell-Aktivität konnten wir in allen vier Testansätzen beobachten sowohl bei Blasen- als auch bei Nieren-Ca-Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien. Hierbei könnte es sich um einen der Mechanismen handeln, die zum Syndrom der entgleisten Immunantwort führen. Diese unspezifische Immundefizienz läßt sich in vitro durch herabgesetzte Lymphozytentransformation (74,81,159) und herabgesetzte Zytotoxizitätsreaktionen nachweisen. In vivo äußert sie sich in klinischer Anergie, die sich beispielsweise bei diesen Patienten in stark verminderten Hautreaktionen vom verzögerten Typ zeigt (21,25,56,83,108).

Wir konnten außerdem bei Patienten mit fortgeschrittenem Nierenkarzinom eine verminderte Gesamtlymphozytenzahl feststellen.

Die von uns gemessene Suppressor-Zell-Aktivität ist unspezifischer Natur, nämlich die Suppression der proliferativen Aktivität allogener Lymphozyten auf einen unspezifischen Reiz hin.

Eine unspezifische Suppression wurde schon in einer Vielzahl von Tierversuchen in verschiedenen Tumormodellen nachgewiesen, wobei spontane, virus-induzierte und durch Karzinogene verursachte Tumoren untersucht wurden (39,49,119).

In Tiermodellen wurde aber auch eine spezifische Suppressor-Zell-Aktivität gegen die Immunantwort auf bestimmte Tumoren nachgewiesen. Fujimoto und Mitarbeiter (44,45) untersuchten Mäuse, die das syngene Methylcholanthren-induzierte Sarkom 1509 a trugen. Eine gute Immunität gegen einen zweiten Kontakt mit dem Tumor war nach chirurgischer Entfernung des Primärtumors induziert. Eine Injektion von T-Zellen von Tumorträgern allerdings führte zu einer spezifischen Hemmung der existierenden Immunität, was sich im Fehlen einer Abstoßung niederschlug.

In letzter Zeit wurde auch eine spezifische Suppressor-Zell-Aktivität durch humane Lymphozyten nachgewiesen. Keystone u.a. (89) konnten experimentell durch Zugabe eines Antigens zu humanen Lymphozyten antigenspezifische T-Suppressorzellen generieren, die die in vitro Antwort plaqueformender Lymphozyten auf dieses Antigen inhibierten.

Kirchner (92,93) ist der Meinung, daß die Suppressorzellen, die die spezifische Antitumorimmunität hemmen, den T-Zellen, die

unspezifisch wirkenden Suppressorzellen dagegen den Makrophagen zuzuordnen sind.

Beim Menschen wurden Suppressorzellen, die in fortgeschrittenen Tumorstadien die Proliferation von Lymphozyten hemmen, nachgewiesen bei verschiedenen lymphatischen Tumoren (114,144,159).

Bei Patienten mit Plasmozytom und M.Hodgkin wird die herabgesetzte Immunitätslage, die sich beispielsweise in einer Hyporeaktivität bei in vitro assays der Lymphoproliferation zeigt (73), neuerdings zum Vorhandensein von Suppressorzellen zugeschrieben und nicht mehr direkt den malignen lymphozytoiden Zellen (37,51,114,144). Es wurde aber auch nachgewiesen, daß neoplastische Zellen von akuten T-Zell-Leukämien selbst potente Suppressorzellen sind (145). Im Gegensatz hierzu wurden bei einigen, aber nicht bei allen Patienten mit Sézary-Syndrom Leukämiezellen mit Helfer-Funktion entdeckt (18).

Einen Überblick über Neoplasien, die von immunregulatorischen Zellen abstammen, gibt Broder (20).

Auch bei soliden Tumoren des Menschen wurden schon Suppressorzellen nachgewiesen, so z.B. beim Malignen Melanom (63) und beim Tonsillenkarzinom (54).

Hersh (75) und Jerrels (81) wiesen als Ursache der Immundefizienz bei Patienten mit Lungenkrebs eine erhöhte Suppressor-Zell-Aktivität nach.

Diese nimmt mit zunehmender Tumorausbreitung zu (Han, 64). Yu und Mitarbeitern gelang der Nachweis tumorspezifischer Suppressor-Lymphozyten bei Patienten mit Osteosarkom (157).

Beim Blasen- und beim Nierenkarzinom wurde bisher noch keine Suppressor-Aktivität nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den Tumorpatienten fanden wir bei den Patienten mit einer Zystitis, mit Ausnahme des PWM-Tests, eine entgegengesetzte, auf allogene Lymphozyten stimulierend wirkende Aktivität, wie sie durch Lymphozyten mit Helfer-Funktion bewirkt wird.

Auch Han fand bei einer Kontrollgruppe von Patienten mit gutartigen Lungenerkrankungen im Test mit PHA eine Helfer-Aktivität (64). Andere Autoren wiesen bei chronischen Infektionen eine Suppressor-Zell-Aktivität nach, so z.B. Stobo bei Patienten mit chronischen Pilzinfektionen (136).

Bei allen diesen Testen muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß es sich um in vitro-Bestimmungen handelt. Inwieweit die in vitro nachgewiesene Suppressor-Zell-Aktivität auch in vivo wirksam wird, muß erst noch genauer untersucht werden.

6.4.5. Aspekte im Hinblick auf die Tumorthherapie

Bei Mäusen fand man zum Zeitpunkt der Resektion eines transplantablen Tumors eine ausgeprägte suppressive Aktivität der Milzzellen und im Serum. 21 Tage nach der Resektion hatte sich die überhöhte Suppressor-Zell-Aktivität normalisiert und auch aus dem Serum waren die inhibierenden Faktoren verschwunden (Cascoyne, 47). Nach einer chirurgischen Tumorentfernung normalisiert sich also die Immunregulation wieder.

Chemotherapie und Bestrahlung könnten möglicherweise durch einen indirekten Effekt auf die Suppressorzellen auch zusätzliche Wirkung neben der direkt auf den Tumor gerichteten erzielen (7,122). Die oft beobachtete Besserung der Immunreaktionen nach solchen Behandlungen könnte auf einer gesteigerten Wirkung sich schneller erholender zytotoxischer Lymphozyten beruhen gegenüber den Suppressorzellen, die erst nach längerer Zeit wieder aktiv werden. Hersh (75) beschrieb, daß bei 75 % verschiedener Karzinompatienten (Bronchial-Ca, Sarkom, Leukämie) mit Suppressor-Zell-Aktivität diese nach Bestrahlung der Lymphozyten mit 4-6000 rad nicht mehr nachweisbar war. Bei 33 % seiner Tumorpatienten verschwand die suppressive Aktivität nach Zugabe von Thymushormon. Keinen Schaden hingegen nahm die Suppressor-Zell-Funktion bei einer Bestrahlung mit 1000 rad (Chiu, 27).

Die Immuntherapie mit BCG und Corynebakterium parvum hat bisher nur relativ wenig Erfolge aufzuweisen. Ein Grund dafür könnte die Aktivierung von Suppressorzellen durch diese Agentien sein, auf

was Versuche von Kirchner und Klimpel-Henney hinweisen (92,95). Ein Rückgang des lokalen Tumorwachstums muß nicht unbedingt mit verbesserter systemischer Immunität einhergehen.

Eine Möglichkeit, Funktionen der Immunregulation für therapeutische Zwecke zu nutzen, wäre die pharmakologische Beeinflussung der Helfer- oder Suppressor-Zell-Aktivität.

Chiu fand, daß Suppressorzellen Cortison- und Cyclophosphamid-sensitiv sind (27). Colchizin (127) und Indometacin (51,52) sollen ebenfalls imstande sein, unter bestimmten Bedingungen die Suppressor-Zell-Aktivität zu senken.

7. ZUSAMMENFASSUNG

=====

1. Im Serum von Blasen- und Nierenkarzinom-Patienten konnten Antitumorantikörper nachgewiesen werden, die in ihrer Menge keine signifikanten Stadiumsunterschiede zeigten.

2. Es handelt sich hierbei vor allem um Antikörper der IgC-Klasse, IgM und IgA spielen keine Rolle.

Auf Blasentumorzellen fortgeschrittener Stadien ließen sich F(ab)₂-Antikörperfragmente vermehrt im Vergleich zu Anfangsstadien nachweisen. Diese Beobachtung könnte durch die enzymatische Kappung des F(c)-Endes durch die entdifferenzierte Tumorzelle bedingt sein, ein Mechanismus, der unter anderen auch die Unwirksamkeit der höheren Antikörperspiegel in fortgeschrittenen Stadien erklären könnte.

Bei Nieren-Ca-Zellen war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt.

3. Diese Antitumorantikörper scheinen zum großen Teil tumorspezifisch zu sein, da neben dem autologen Serum auch Patienten mit dem gleichen Tumor eine positive Reaktion zeigen, während Patienten mit einem anderen Tumor und gesunde Personen nur eine geringe Antikörpermenge in ihrem Serum aufweisen.

Es konnten keine Antikörper gegen normale Blasenschleimhaut und gegen normales Nierengewebe nachgewiesen werden.

4. Es ist möglich, mit Antitumorantikörper enthaltenden Patientenserum Tumorzellen in Blasenspülungen nachzuweisen. Dieser Nachweis gelang auch in Präparaten, bei denen die Papanikolaou-

Färbung nur den Verdacht auf Tumorzellen gestattete. Dieser Befund stimmt überein mit Literaturangaben, nach denen eine immunologische Entdifferenzierung früher einsetzt als eine histomorphologische.

5. Die Gesamtlymphozytenzahl war bei Tumorpatienten aller Stadien leicht und bei Nieren-Ca-Patienten in hohem Stadium in signifikantem Ausmaß erniedrigt. Ebenso war der prozentuale T-Lymphozytenanteil bei allen Tumorpatienten leicht erniedrigt im Vergleich zu gesunden Personen. Die B-Lymphozytenzahl war bei allen untersuchten Karzinompatientengruppen im Normbereich. Während sich die Suppressor-Zell-Aktivität bei Blasen- und Nieren-Ca-Patienten in den Anfangsstadien noch im Normbereich bewegt, ist bei fortgeschrittenem Stadium sowohl beim Blasen- wie auch beim Nierenkarzinom ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen. Dieser Befund wird von uns als einer der Mechanismen für die zunehmende Inaktivierung des Immunsystems bei zunehmender Tumorausbreitung betrachtet.

8. LITERATURVERZEICHNIS

=====

- 1 Ackermann, R. Tumor-Associated Antibodies against Renal Cell Carcinoma Detected by Immunofluorescence
Eur. Urol. 1:154-156 (1975)
- 2 Ackermann, R. Immunologische Aspekte bei Urologischen Tumoren
Med. Kli. 75:436-441 (1980)
- 3 Allison, A.C., Denman, A.M., Cooperating and Controlling Functions of Thymus-derived Lymphocytes in Relation to Autoimmunity
Barnes, R.D. Lancet 2:135-140 (1971)
- 4 Allison, A.C. Immunological Surveillance of Tumors
Cancer Immunol Immunother 2:151-155 (1977)
- 5 Altwein, J.E. Urologie
Enke-Verlag, 1979
- 6 Amin, M., Lich, R.jr. Lymphocytes and Bladder Cancer
J. Urol. 111:165 (1974)
- 7 Anderson, R.E., Warner, N.L. Ionizing Radiation and the Immune Response
Adv. Immunol. 24:215-335 (1976)
- 8 Asma, G.E.M., Schuit, H.R.E., The Determination of Numbers of T- and B-Lymphocytes in the Blood of Children and Adults by the Direct Immunofluorescence Technique
Clin. Exp. Immunol. 29:286-294 (1977)
- 9 Bach, J.F. Evaluation of T-Cells and Thymic Serum Factors in Man Using the Rosette Technique
Transplant. Rev. 16:196 (1973)

- 10 Baldwin, R.W., Price, M.R., Robbins, R.A. Blocking of Lymphocyte-mediated Cytotoxicity for Rat Hepatoma Cells by Tumor-Specific Antigen-Antibody Complexes
Nature (New Biol) 238:185-187 (1972)
- 11 Bean, M.A., Pees, H., Fogh, J.E., Grabstad, H., Oettgen, H.F. Cytotoxicity of Lymphocytes from Patients with Cancer of the Urinary Bladder. Detection by a ³H-Proline Micocytotoxicity Test
Int. J. Cancer 14:186-197 (1974)
- 12 Bichler, K.H., Ax, W., Tautz, C.H. Cell-mediated Immunity in Patients with Renal Adenocarcinoma
Europ. Urol. 1:231 (1975)
- 13 Birkmayer, J.G.D. Tumorantigene - Nachweis in menschlichen Melanomen, Gliomen und Nierenkarzinomen- Klinische Relevanz
Inaugural-Dissertation an der LMU 1979
- 14 Böyum, A. Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. 97):77 (1968)
- 15 Bohle, A. "Niere und Ableitende Harnwege" in Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie" von M. Eder und P. Gedigk
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1975)
- 16 Brandis, H. Einführung in die Immunologie
Gustav Springer, 140-144 (1975)
- 17 Broder, S., Whitehouse, F.jr. Immunologic Enhancement of Tumor Xenografts by Pepsin Degraded Immunoglobulin
Science 162:1494-1495 (1968)

- 18 Broder, S., Edelson, R.L., Lutzner, M.A. The Sézary-Syndrom: A Malignant Proliferation of Helper T Cells
J. Clin. Invest. 58:1297-1306 (1976)
- 19 Broder, S., Waldmann, T.A., The Suppressor-Cell Network in Cancer
New Engl. J. Med. 299:1281-1284 und 1335-1341 (1978)
- 20 Broder, S., Uchiyama, T., Waldmann, T.A. Neoplasms of Immunoregulatory Cells
Am. J. Clin. Pathol. 72:724-731 (1979)
- 21 Brosman, S., Elhilali, M., Vescera, C., Fahey, J. Immune Response in Bladder Cancer Patients
J. Urol. 121:162-169 (1979)
- 22 Bukowski, R.M., Barna, B., Deadnar, S.D., Hewlett, J.S. Non Specific Lymphocyte Cytotoxicity in Patients with Malignant Melanoma, Renal Cell Carcinoma and Sarcoma and in non Tumor Patients
Cancer (Philad.) 38:1862 (1976)
- 23 Bubenik, J.P., Perlmann, P., Heimstein, K., Moberger, G. Immune Response to Urinary Bladder Tumors in Man
Int. J. Cancer 5:39 (1970)
- 24 Burnet, F.M. The Concept of Immunological Surveillance
Progr. Exp. Tumor Res. (Basel) 13:1 (1970)
- 25 Ctalona, W.J., Chretien, P.B. Correlations among Host Immunocompetence and Tumor Stage, Tumor Grade and Vaskular Permeation in Transitional Carcinoma
J. Urol. 110:526 (1973)
- 26 Charč, T. Immunological Enhancement by Mouse Iso-antibodies: The Importance of Complement Fixation
Immunology 14:583-589 (1968)

- 27 Chiu, K.M., Faanes, R.B., Choi, Y.S. Activation of Specific Suppressor-Cells with Heat-treated Allogeneic Tumor Cells
Cell. Immunol. 49:283-292 (1980)
- 28 Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47:200 (1941)
- 29 Coons, A.H. Fluorescent Antibody as Histochemical Tools
Fed. Proc. 10:553-559 (1951)
- 30 Dekernion, J.B., Ramming, K.P., Gupta, R.K. The Detection and Clinical Significance of Antibodies to Tumor-Associated Antigens in Patients with Renal Cell Carcinoma
J. Urol. 122:300-305 (1979)
- 31 de Voogt, H.J., Wielinga, G. Clinical Aspects of Urinary Cytology
Acta Catol. 16:349-351 (1972)
- 32 Di Luzio, N.R. Lysozyme, Glucan-Activated Makrophages and Neoplasia
J. Retikuloendothel. Soc. 26:67-81 (1979)
- 33 Di Luzio, N.R., McNamee, R.E., Williams, D.L., Cilbert, K.M., Spanjers, M.A. Glucan Induced Inhibition of Tumor Growth and Enhancement of Survival in a Variety of Transplantable and Spontaneous Murine Tumor Models
aus: "Makrophages and Lymphocytes, Part A", ed. by M.R. Escorber and H. Friedman, New Orleans (1980)
- 34 Ehrlich, P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. In: The Collected Papers of Paul Ehrlich, Vol. 11, 550
London, Pergamon (1957, 1908)

- 35 Elhilali, M.M., Navah, S. Immunologic Evaluation of Human Renal Cell Carcinoma
Invest. Urol. 13:60 (1975)
- 36 Engleman, E.G., Hoppe, R., Kaplan, H. Suppressor Cells of the Mixed Lymphocyte Reaction in Healthy Subjects and Patients with Hodgkin's Disease and Sarcoidosis
Clin. Res. 26:513 A (1978)
- 37 Engleman, E.G., Benike, C., Hoppe, R., Kaplan, H.S. Suppressor-Cells of the Mixed Lymphocyte Reaction in Patients with Hodgkin's Disease
Transpl. Proc. Vol XI, Nr. 4 (1979)
- 38 Faulconer, R.J., Rosato, F.E. Detection and Isolation of Antigen Associated with Renal Cell Carcinoma
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 19:308 (1978)
- 39 Fernbach, B.R., Kirchner, H. Suppression of Mixed Lymphocyte Reactivity in Mice Bearing Primary Tumours Induced by Murine Sarcoma Virus
Transplantation 21:381 (1976)
- 40 Fish, F., With, I.P., Klein, G. Tumour-bound Immunoglobulins.
The Fate of Immunoglobulin Disappearing from the Surface of Coated Tumour Cells
Clin. Exp. Immunol. 16:355-365 (1974)
- 41 Floyd, R.A., Fernandes, G., Good, R.A. The Natural Killer Cell
Clin. Bull. 9:146-147 (1979)
- 42 Barksdale, J.A., Koontz, W.A.jr. Current Practice of Urinary Bladder Cytology
Caner Research 37:2800-2805 (1977)
- 43 Franks, C.R., Williams, Y. Prognostic Value of Peripheral Lymphocyte Count in Hormone Therapy of Advanced Breast Cancer
Br. J. Cancer 34:641-644 (1976)

- 44 Fujimoto, S., Greene, M., Regulation of the Immune Response to
Sehon, A.H. Tumor Antigens
I Immunosuppressor Cells in Tumor-
Bearing Mice
J. Immunol. 116:791 (1976)
- 45 " Regulation of the Immune Response to
Tumor Antigens
II The Nature of Immunosuppressor-Cells
in Tumor-Bearing Mice
J. Immunol. 116:800 (1976)
- 46 Gangl, A., Smolen, J.S. Suppressor Cell Activity in Patients
Menzel, J., Wolf, C., with Inflammatory Bowel Disease
Knapp, W. Immunobiol. 156 Nr. 3:278 (1979)
- 47 Gascoyne, R.D., Whitney, R.B. Recovery of Immunocompetence after
Levy, J.G. Tumorresection in Mice: Correlation
with Loss of Suppressor Elements
Br. J. Cancer 37:190 (1978)
- 48 Gershon, R.K. T-Cell Control of Antibody Production-
in "Cont. Top. Immunobiol.", edited by
M.D. Cooper and N.L. Warner
Vol. 3, Plenum Press, New York (1974)
- 49 Glaser, M., Kirchner, H., Inhibition of Cell-mediated Cytoto-
Holden, H.T., Herberman, R.B. xicity against Tumor-associated Anti-
gens by Suppressor-Cells from Tumor-
bearing mice
J. Nat. Cancer Inst. 56:856 (1976)
- 50 Goldstein, G., Klein, G., Direct Membrane Immunofluorescence
Pearson, G., Clifford, P. Reaction of Burkitt's Lymphoma Cells
in Culture
Cancer Res. 29:749 (1969)

- 51 Goodwin, J.S., Messner, R.P., Bankhurst, A.D. Prostaglandin-producing Suppressor-Cells in Hodgkin's Disease
N Engl. J. Med. 297:963-968 (1977)
- 52 Goodwin, J.S., Bankhurst, Messner, R.P. Suppression of Human-T-Cell-Mitogenesis by Prostaglandin. Existence of a Prostaglandin-producing-Suppressor-Cell
J. Exp. Med. 146:1719-1733 (1977)
- 53 Gorski, A., Rowinska, D., Skopinska, E., Orlowski, T. Circulating Suppressor-Cells in Aplastic Anemia
Vox Sang. 36:356-361 (1979)
- 54 Gruber, F., Hammer, C., Mang, W.L., Brendel, W., Naumann, H. Immunological Studies of Patients with Carcinoma of the Floor of the Oral Cavity and the Tonsil
Immunobiol. 156 Nr. 3:268 (1979)
- 55 Gruber, F. Immunologie des Tonsillenkarzinoms
Inaugural-Dissertation an der LMU (1982)
- 56 Guineau, P., McKiel, C. Cellular Immunity in Bladder Cancer Patients
J. Urol. 119:747-749 (1978)
- 57 Gunven, P., Klein, G., Henle, W., Henle, C., Rocchi, G., e.a. Immunological Studies on a Case of Recurrent Burkitt's Lymphoma during Immune Stimulant Therapy Treatment
Int. J. Cancer 12:115-123 (1973)
- 58 Gupta, N.P., Malariya, A.N., Singh, S.M. Rheumatoid Factor: Correlation with Recurrence in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder
J. Urol. 121:417-418 (1979)
- 59 Habegger, R., Toggenburg, H., Brand, H.P., Bandhauer, K. Ergebnisse der Transurethralen Tumoresektion beim Blasenkarzinom
aktuelle urologie 11:201-207 (1980)

- 67 Hellström, K.E., Hellström, I. Lymphocyte-mediated Cytotoxicity and Blocking Serum Activity to Tumor Antigens
Advanc. Immunol. 18:209 (1974)
- 68 Herberman, R.B. Cell-mediated Immunity to Tumor Cells
Advanc. Cancer Res. 19:207 (1974)
- 69 Herberman, R.B. Immunologic Approaches to the Diagnosis of Cancer
Cancer (Philad) 37:549 (1976)
- 70 Herberman, R.B., Djeu, J.Y., May, H.D., e.a. Natural Killer Cells: Characteristics and Regulation of Activity
Immunol. Rev. 44:43-70 (1979)
- 71 Hering, H., Weidner, W., Hering, F. CEA-Bestimmungen bei Karzinomen des Urogenitaltraktes
Med. Lab. 29:193 (1976)
- 72 Herr, H.W. Immunobiology of Human Bladder Cancer
J. Urol. 115:147-149 (1976)
- 73 Hersh, E.M., Oppenheim, J.J. Impaired in vitro Lymphocyte Transformation in Hodgkin's Disease
N. Engl. J. Med. 273:1006 (1965)
- 74 Hersh, E.M. Immunology of Cancer
Cancer Bull. 31:67 (1975)
- 75 Hersh, E.M., Patt, Y.Z., Murphy, S.G., Dicke, K., Zander, A., Adegbite, M., Goldman, R. Radiosensitive, Thymic Hormone-sensitive Peripheral Blood Suppressor Cell Activity in Cancer Patients
Cancer Res. 40:3134-3140 (1980)
- 76 Holland, J.M. Cancer of the Kidney - Natural History and Staging
Cancer (Philad.) 32:1017 (1973)

- 77 Hunninghake, G.W., Fauci, A.S. Suppression on the Generation of Human ConA Induced Cytotoxicity Effector Cells by ConA Activated Suppressor Cells
J. Immunol. 120:1828 (1978)
- 78 Ionescu, G., Romas, N.A., Carcinoembryonic Antigen and Bladder-
Ionescu, L., Bennett, S., e.a. Carcinoma
J. Urol. 115:46-48 (1976)
- 79 Jakse, G., Hofstädter, F. Further Experience with the Specific Red Cell Adherence Test (SRCA) in Bladder Cancer
Euro. Urol. 4:356-360 (1978)
- 80 Jerne, N.K. Antigen-dependent Immunoregulation
The Harvey Lectures Academic Press, New York (1975)
- 81 Jerrels, T.R., Dean, J.H., Role of Suppressor Cells in Depression
McKoy, J.L., Richardson, G.L., of in vitro Lymphoproliferative Re-
Herberman, R.B. sponses of Lung and Breast Cancer Patients
J. Natl. Cancer Inst. 61:1001-1009 (1978)
- 82 Johnson, W.D. Cytopathological Correlations in Tumors of the Urinary Bladder
Cancer 17:867-880 (1964)
- 83 Jondal, M., Holm, G., Surface Markers on Human T- and B-
Wigzell, H. Lymphocytes
J. Exp. Med. 136:207 (1972)
- 84 Jonsson, V. Technical Aspects of the Rosette Technique for Human Circulating B- and T-Lymphocytes. Normal Values and some Remarks on Null-Lymphocytes
Scand. J. Hämat. 13:361

- 85 Jonysma, A.P.H., Hijmans, W., Quantitative Immunfluorescence, Standardization and Calibration in Mikrofluorometry
Histochemie 25:329 (1971)
- 86 Katz, S.I., Parker, D., Turk, B-Cell Suppression of Delayed Hypersensitivity Reactions
J.L. Nature 251:550 (1974)
- 87 Katz, S.I., Parker, D., Turk, Suppressor Cells in Delayed Hypersensitivity Reactions
J.L. Mayo Clin. Proc. 49:537-540 (1974)
- 88 Keisari, Y., Witz, I.P. Degradation of Immunglobulins by Lysosomal Enzymes of Tumors: I Demonstration of the Phenomenon Using Mouse Tumors
Immunochemistry 10:565 (1973)
- 89 Keystone, E.C., Gladman, D.D., Antigen Specific Suppressor Cell Activity in Man: I Temporal, Antigenic and Proliferative Requirements
Cane, D. Cell. Immunol. 55:136-144 (1980)
- 90 Nicssling, P., Petranfy, C., Killer Cells: A Functional Comparison between Natural, Immune T-Cells
Kärre, K., Jondal, M., Tracey, D., Wiggzell, H. and Antibody-Dependent in Vitro Systems
J. Exp. Med. 143:772-780 (1976)
- 91 Kirchner, H., Holden, H.T. Splenic Suppressor Macrophages Induced in Mice by Injection of Corynebacterium parvum
Herberman, R.B. J. Immunol. 115:1212-1216 (1975)

- 92 Kirchner, H., Glaser, M.,
Herberman, R.B. Suppression of Cell-mediated
Tumour Immunity by *Corynebacterium parvum*
Nature 157:396-398 (1975)
- 93 Kirchner, H. Suppressor Cells of Immune Reactions
in Malignancy
Eur. J. Cancer 14:453:459 (1978)
- 94 Klein, G., Clifford, P.,
Klein, E., Stjernward, J. Search for Tumor-Specific Immune
Reactions in Burkitt-Lymphoma Pa-
tients by the Membrane Immunofluores-
cence Reaction
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)
55:1628 (1966)
- 95 Klimpel, G.R., Henney, C.S. BCG-induced Suppressor Cells: I De-
monstration of a Macrophage-like
Suppressor Cell, that Inhibits Cyto-
toxic T-Cell Generation in vitro
J. Immunol. 120:563:569 (1978)
- 96 Kurland, J.I., Kincade, F.W.,
Moore, M.A.S. Regulation of B-Lymphocyte Clonal
Proliferation by Stimulatory and In-
hibitory Macrophage-derived Factors
J. Exp. Med. 146:1420-1435 (1977)
- 97 Lay, W.H., Mendes, N.F.,
Bianco, C., Nussenzweig, V. Binding of Sheep Red Cells to a
Large Population of Human Lympho-
cytes
Nature (London) 230:531 (1971)
- 98 Lewis, M.G., Ikonopisov, R.L.,
Nairn, R.C., Phillips, T.M.,
Hamilton-Fairlay, G., Bodenham, D.C., Alexander, P. Tumor-specific Antibodies in Human
Malignant Melanoma and their Rela-
tionship to the Extent of the
Disease
Brit. Med. J. 3:547-552 (1969)

- 99 Lewis, M.G., Phillips, T.M. The Specificity of Surface Membrane Immunofluorescence in Malignant Melanoma
Int. J. Cancer 10:105 (1972)
- 100 Lewis, M.G., Phillips, T.M., Rowden, C., Hammer, C. Einfluß humoraler Immunmechanismen auf die Metastasierung menschlicher Tumoren
Münch. Med. Wschr. 119, Nr. 43:1393-1396 (1977)
- 101 Lewis, M.G., Phillips, T.M., Rowden, G., Jerry, L.M. Humoral Immune Reactions in Cancer Patients
In "The Handbook of Cancer Immunology" Vol. 3, edited by H. Waters Carland STPM Press, New York and London (1978)
- 102 Lind, J. The Formation of Antibodies against Hidden Determinants of Autologous IgG during Immunization of Rabbits with Staphylococcus Aureus
Scand. J. Immunol. 3:689-696 (1974)
- 103 Lotzová, E., McCredie, K.B. Natural Killer Cells in Mice and Man and Their Possible Biological Significance
Cancer Immunol. Immunother. 4:215-221 (1978)
- 104 Maluish, A., Halliday, W.J. Cell-mediated Immunity and Specific Serum Factors in Human Cancer: The Leukocyte Adherence Inhibition Test
J. Natl. Cancer Inst. 52:4215 (1974)
- 105 Mancell, P.W.A., Ichinose, H., Reed, R.J., Krementz, E.T., McNamee, R.B., Di Luzio, N.R. Macrophage-Mediated Destruction of Human Malignant Cells in Vivo
J. Nat. Cancer Inst. 54: 571-580 (1975)

- 106 McDevitt, Landy, M. Genetic Control of Immune Responsiveness
Academic Press, New York + London (1972)
- 107 McKhann, C.F., Yarlott, M.A.jr. Tumourimmunology
Cancer 25(4): 187-197 (1975)
- 108 Merrin, C., Han, T. Immune Responses in Bladder Cancer
J. Urol. 111:170 (1974)
- 109 Moretta, L., Webb, S.R. Functional Analysis of two Human
Grosis, C.E., Lydyard, P.M., T-Cell Subpopulations Help and
Cooper, M.D. Suppression of B-Cell Responses by
T-Cells Bearing Receptors for IgM or IgG
J. Exp. Med. 146:184-200 (1977)
- 110 Morton, D.L., Malmgren, R.A., Demonstration of Antibodies against
Hilmes, E.C., Ketcham, A.S. Human Malignant Melanoma by Immuno-
fluorescence
Surgery 64:233 (1968)
- 111 Nelson, D.S. Nonspecific Immunoregulation by Macro-
phages and their Products, in "Immunobiology of the Macrophage"
Edited by D.S. Nelson, New York, Academic Press 235-257 (1976)
- 112 O'Toole, C. A ⁵¹Chromium Isotope Release Assay
for Detecting Cytotoxicity to Human Bladder Carcinoma
Int. J. Cancer 19:324-331 (1977)
- 113 Oudin, J. The Genetic Control of Immunoglobulin
Synthesis
Proc. Roy. Soc. (London) 166:207 (196

- 114 Paglieroni, T., Mackenzie, M.R. Studies of the Pathogenesis of an Immune Defect in Multiple Myeloma J. Clin. Invest. 59:1120-1133 (1977)
- 115 Papanicolaou, G.N., Marshall, V.F. Urine Sediment Smears as a Diagnostic Procedure in Cancer of the Urinary Tract Science 101:519-520 (1945)
- 116 Pascal, R.R., Iannaoccone, P.M., Rollwagen, F.M., Harding, T.A., Bennett, S.J. Electron Microscopy and Immunofluorescence of Glomerular Immune Complex Deposits in Cancer Patients Cancer Res. 36(1):43-47 (1976)
- 117 Phillips, T.M., Lewis, M.C. Immune Reactions in Patients with Bladder and Prostatic Cancer Aust. NZ. Surg. 48(5) (1978)
- 118 Phillips, T.M., Lewis, M.G. A System of Immunofluorescence in the Study of Tumor Cells Rev. Eur. Etud. Clin. Biol. 15:1016 (1970)
- 119 Poupon, M.F., Kolb, J.P., Lespinats, G. Evidence for Splenic Suppressor Cells in C3H/He, T-Cell-Deprived C3H/He and Nude Mice Bearing a 3-Methylcholanthren Induced Fibrosarcoma J. Nat. Cancer Inst. 57:1241 (1976)
- 120 Rich, R.R., Pierce, C.W. Biological Expressions of Lymphocyte Activation. III Suppression of Plaque-forming Cell Responses in vitro by Supernatant Fluids from ConA Activated Spleen Cell Cultures J. Immunol. 112:1360 (1974)
- 121 Rodkey, L.S. Studies of Idiotypic Antibodies. Production and Characterisation of Auto-anti-idiotypic Antisera J. Exp. Med. 139:712 (1974)

- 122 Röllinghoff, M., Starzinski, Ponitz, A., Pfizenmaier, K., e.a. Cyclophosphamide-sensitive T-Lymphocytes Suppress the in vivo Generation of Antigen Specific T-Lymphocytes
J. Exp. Med. 145:455-459 (1977)
- 123 Sadoughi, N., Rubenstone, A., Mlsna, J., Davidsohn, I. The Cell Surface Antigens of Bladder Washing Specimens in Patients with Bladder Tumors, a New Approach
J. Urol. 123:19-21 (1980)
- 124 Salzner, H.J., Schmiedel, N., Druschky, K.F., Kalden, J.R. Concanavalin-A Induced Suppressor Cells in the Peripheral Blood of Patients with Myasthenia Gravis and Normal Controls
Immunobiol. 156(3): 283 (1979)
- 125 Scherberich, J.E. Analysis of Plasmamembrane (PM) Antigens from Human Renal Adenocarcinoma. Evidence of PM-Precursors in the Proximal Tubule of Normal Kidney
Immunobiol. 157:274 (1980)
- 126 Schmidt, J.D., Feldbush, T.L. Serum Immunoglobulins in Genitourinary Malignancies
J. Urol. 115(3):293-295 (1976)
- 127 Shek, P.N., Waltenbaugh, C., Coons, A.H. Effect of Colchizine on the Antibody Response: II Demonstration of the Inactivation of Suppressor Cell Activities by Colchizine
J. Exp. Med. 147:1228-1235 (1978)
- 128 Shou, L., Schwartz, S.A., Good, R.A. Suppressor Cell Activity after ConA Treatment of Lymphocytes from Normal Donors
J. Exp. Med. 143:1100 (1976)

- 129 Siegal, F.P., Siegal, M. Enhancement by Irradiated T-Cells of Human Plasma Cell Production: Dissection of Helper- and Suppressor Functions in vitro
J. Immunol. 118:642 (1977)
- 130 Singhal, S.K., Sinclair, N.R. Suppressor Cells in Immunity
The University of Western Ontario Press
London (1975)
- 131 Sigel, M. The Immunology of Cancer of the Urinary Bladder, in "Handbook of Cancer Immunology" Vol 3, pp. 263. Edited by H. Waters Gerland STPM Press, New York and London (1978)
- 132 Sjögren, H.O., Hellström, I., Suggestive Evidence, that the "blocking antibodies" of Tumor-Bearing Individuals may be Antigen-Antibody Complexes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68:1372-75 (1971)
- 133 Sofen, H., O'Toole, C. Anti-Squamous Tumor Antibodies in Patients with Squamous Cell-Carcinoma
Cancer Res. 38:199-203 (1978)
- 134 Sparks, F.C., Wile, A.C., Ramming, K.P., Silver, H.K.B., Wolk, R.W., Morton, D.L. Immunology and Adjuvant Chemotherapy of Breast Cancer
Arch. Surg. 111:1057 (1976)
- 135 Steinberg, A.D., Cershwin, M.E., Gerber, N.L., e.a. Role of Suppressor Cells in the Pathogenesis of Autoimmunity in New Zealand Mice, Immune Depression and Cancer
Edited by G.W. Siskind, C.L. Christian, S.D. Litwin, New York, Grune & Stratton 42-62 (1975)

- 136 Stobo, J.D., Paul, S.,
van Scoy, R.E., Hermans, P.E. Suppressor Thymus-derived Lymphocytes in Fungal Infections
J. Clin. Invest. 57:319 (1976)
- 137 Takasugi, M., Mickey, M.R.,
Terasaki, P.I. Studies on Specificity of Cell-mediated Immunity to Human Tumors
J. Natl. Cancer Inst. 53:1527 (1974)
- 138 Talal, N., Steinberg, A.D. The Pathogenesis of Autoimmunity in New Zealand Black Mice
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 64: 79-103 (1974)
- 139 Talmadge, J.E., Meyers, K.M.,
Priour, D.J., Starker, J.R. Role of Natural Killer Cells in Tumor Growth and Metastasis: C57BL/6 Normal and Beige Mice
JNCI, 65:929-935 (1980)
- 140 Taussig, M.J. Antigen-specific Suppressor-T-Cell Factors
Cancer Immunol. Immunother. 9:23-30 (1980)
- 141 Taylor, R.B., Basten, A. Suppressor-Cells in Humoral Immunity and Tolerance
Brit. Med. Bull. 32:152 (1976)
- 142 Thomas, D.W., Roberts, W.K.,
Talmadge, D.W. Regulation of the Immuneresponse: Production of a Soluble Suppressor Immune Spleen Cells in vitro
Immunobiol. 114:1616 (1975)
- 143 Thomas, L. Discussion, p. 529 in "Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitivity States" (Laurence, H.S., ed.)
New York: Höber-Harper (1959)

- 144 Twomey, J.J., Laughter, A.H., Farrow, S., e.a. Hodgkin's Disease: An Immunodepleting and Immunosuppressive Disorder
J. Clin. Invest. 56:467-475 (1975)
- 145 Uchiyama, T., Sagawa, K., Takatsugi, K. Effect of Adult T-Cell-Leukemia Cells on Pokeweed Mitogen Induced Normal B-Cell-Differentiation
Clin. Immunol. Immunopath. 10:24-34 (1978)
- 146 Ueda, R., Shiku, H., Whitmore, Serological Analysis of Cell Surface Antigens of Human Renal Cancer
Amer. Ass. Cancer Res. 19:198 (1978)
- 147 Union Internationale Contre le Cancer (UICC) TNM-Klassifizierung der malignen Tumoren und Allgemeine Regeln zur Anwendung des TNM-Systems,
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1976)
- 148 Waldmann, T.A., Broder, S. Suppressor-Cells in the Regulation of the Immuneresponse
in "Progress in Clinical Immunology" (edited by R.S. Schwartz) 155, Grune and Stratton, New York (1977)
- 149 Waller, H. Correlation between Diagnosis and Results of Serologic Tests for Antoglobulin-Antibodies
Amer. J. Med. 54:731 (1973)
- 150 Warnatz, H. Tumorimmunologie
Thieme-Verlag, Stuttgart (1975)

- 151 White, H., Griffiths, J.D. Circulating Malignant Cells and Fibrinolysis during Resection of Colorectal Cancer
Proc. Roy. Soc. Med. 69:467-469 (1976)
- 152 Wick, G., Baudner, S., Herzog, F. Immunfluoreszenz-Beiträge zur Theorie und Praxis der Immunfluoreszenz
Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg (1976)
- 153 Wiggishoff, C.C., McDonald, J.H. Urinary Exfoliative Cytology in the Diagnosis of Bladder Tumours
Acta Catol, 16:139-141 (1972)
- 154 Wood, W.C., Morton, D.L. Microcytotoxicity Test: Detection in Sarcoma Patients of Antibody Cytotoxic to Human Sarcoma Cells
Science, 170:1318 (1970)
- 155 Wybran, J., Fundenberg, H.H. Thymus-derived Rosette-forming Cells in Various Human Disease States: Cancer, Lymphoma, Bacterial and Viral Infection and other Diseases
J. Clin. Invest. 52:1026 (1971)
- 156 Wybran, J., Carr, M.C., Fundenberg, H.H. The Human Rosette-forming Cell as a Marker of a Population of Thymus-derived Cells
J. Clin. Invest. 57:762 (1972)
- 157 Yu, A., Watts, H., Jaffe, N. Parkman, R. Concomitant Presence of tumor-specific Cytotoxic and Inhibitor Lymphocytes in Patients with Osteogenic Sarkom
N. Engl. J. Med. 297:121-127 (1977)

- 158 Zembala, M., Asherson, C.L.,
Noworolski, J., e.a. Contact Sensitivity to Picrylchlorid:
The Occurrence of B-Suppressor Cells
in the Lymphnodes and Spleen of
Immunized Mice
Cell. Immunol. 25:266-278 (1976)
- 159 Zembala, M., Mytar, B., Popiela
T., e.a. Depressed in vitro Peripheral Blood
Lymphocyte Response to Mitogens in
Cancer Patients: The Role of Suppres-
sor Cells
Int. J. Cancer 19:605-613 (1977)
- 160 ZilkO, P.J., Dawkins, R.L.,
Holmes, K., Witt, C. Genetic Control of Suppressor Lympho-
cyte Function in Myasthenia gravis:
Relationship of Impaired Suppressor
Function to HLA-B8/DRW3 and Cold
Reactive Lymphocytotoxic Antibodies
Clin. Immunol. Immunother. 14
222-230 (1979)

9. A N H A N G

=====

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. W. Brendel möchte ich danken für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für Chirurgische Forschung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer für die Einführung in die Grundlagen der Tumorummunologie und für seine ständigen Anregungen und Ratschläge im Verlauf der Arbeit.

Auch bei Herrn Prof. Dr. Egbert Schmiedt, Direktor der Urologischen Klinik der Universität München, und bei seinem Oberarzt Herrn Dr. med. habil. Ch. Chaussy möchte ich mich sehr herzlich bedanken dafür, daß sie mir Material für die Experimente zur Verfügung stellten.

Herrn Zwingers von der Gesellschaft für medizinische Informationsarbeitung danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Ausarbeitung der Daten.

Für die stetige technische Unterstützung und ihre dauernde Hilfsbereitschaft möchte ich mich besonders bedanken bei Frl. A. Allmeling, Frl. H. Bayer, Frl. G. Höbel, Frl. Ch. Csapo sowie bei meinem Freund Franz Gruber.

Lebenslauf:

Geboren am 28.9.1956 in Eggenfelden, Landkreis Rottal-Inn, als erstes Kind des Buchhaltungsvorstands Emil Weinfurtner und seiner Frau Maria, geborene Kattum.

1962 - 1966 Besuch der Volksschule in Massing, Landkreis Rottal-Inn

1966 - 1975 Besuch des St. Michaels-Gymnasiums der Benediktiner in Metten, Landkreis Deggendorf

Juni 1975 Hochschulreife

WS 1975/76 Beginn des Medizinstudiums an der Universität München

August 1977 Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung

August 1978 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

August 1980 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

3. November 1981 Beendigung des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

5. November 1981 Ärztliche Approbation

Famulaturen: Kreiskrankenhaus Eggenfelden, Praxis Dr. Kattum in Kelheim, Praxis Dr. Helmes in Grünwald

Praktisches Jahr: HNO - Klinik Großhadern, 1. Medizinische Klinik (Okt. 80 - des Westkrankenhauses Augsburg, Neurochirurgische
 Klinik und Chirurgische Klinik Großhadern
 Sept. 81)

Dezember 1978 Beginn mit der Doktorarbeit am Institut für Chirurgische Forschung

Seit dem 21. August 1981 verheiratet mit Frau Christine, geborene Mörtl.

